

Aus der Abteilung für Neuropharmakologie
des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie
in München

Direktor: Prof. Dr. Albert Herz

DIE INTERAKTION VON SUFENTANIL MIT SPEZIFISCHEN
BINDUNGSSTELLEN IM ZNS

Ein Beitrag zur Charakterisierung multipler
Opiatrezeptoren

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Claudia Stautner
Ingolstadt

1984

Aus der Abteilung für Neuropharmakologie
des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie
in München

Direktor: Prof. Dr. Albert Herz

DIE INTERAKTION VON SUFENTANIL MIT SPEZIFISCHEN
BINDUNGSSTELLEN IM ZNS

Ein Beitrag zur Charakterisierung multipler
Opiatrezeptoren

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Claudia Stautner
Ingolstadt

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Herz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Forth
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 6.12.1984

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Herz
für die Überlassung des Dissertationsthemas danken.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. M. Wüster meinen Dank
aussprechen für die freundliche Unterstützung und
Beratung bei der Durchführung vorliegender Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINFÜHRUNG	1
1.1. Klassische Opiate	1
1.2. Opiatrezeptoren	4
1.3. Endorphine und opiatähnlich wirkende Peptide	6
1.4. Multiple Opiatrezeptoren	10
1.5. Problemstellung	15
2. METHODIK UND VORGEHENSWEISE	18
2.1. Theorie der Bindungsstudien	18
2.2. Praktische Durchführung von Bindungsstudien	27
2.2.1. Tiere, Materialien, Geräte	27
2.2.2. Herstellung des Gewebehomogenates	29
2.2.3. Erhebung der Bindungsdaten	31
3. ERGEBNISSE	35
3.1. Bindungsverhalten verschiedener μ -, δ - und κ -Liganden	35
3.2. Bindungsverhalten selektiver μ -Liganden	37
3.3. Analyse der Sufentanil- und Dihydromorphin- Bindung mittels der Darstellung nach Scatchard	39
3.3.1. Maximale Anzahl der Bindungsstellen	39
3.3.2. Gegenseitige Regulation der Bindung	41
3.4. Versuche zur Frage der möglichen κ -Affinität von Sufentanil	44
3.5. Verteilung der Bindungsstellen von Sufentanil und Dihydromorphin in den verschiedenen Gehirnarealen	51

3.6. Beeinflussung des Bindungsverhaltens von Sufenta- nil und Dihydromorphin	53
3.6.1. Einfluß von Ionen	53
3.6.2. Einfluß von Guanidyltriphosphat	55
4. DISKUSSION	57
5. ZUSAMMENFASSUNG	67
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	70
7. LITERATURVERZEICHNIS	71

1. EINFÜHRUNG

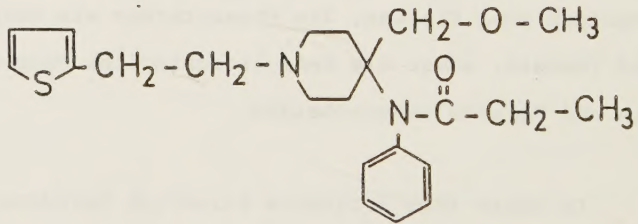
1.1. Klassische Opiate

Die Opiate gehören zu den ältesten in der Medizin verwendeten Pharmaka. Opium war wahrscheinlich schon 4000 v.Chr. den Sumerern bekannt. Im klassischen Griechenland wurde es häufig als Droge verwendet und zwar sowohl wegen seiner stark analgetischen als auch wegen seiner euphorisierenden Wirkung. Das Wort "Opium" geht auf das griechische "Opion" zurück, was soviel bedeutet wie "Saft". Opium ist ein Bestandteil des milchig braunen Saftes der Kapseln des Schlafmohns *Papaver somniferum* (89). Opium enthält als Wirkstoff etwa 25 verschiedene Alkaloide. Dabei lassen sich chemisch zwei Klassen, die Phenanthrene wie Morphin, Codein und Thebain, sowie die Benzylisochinoline Papaverin, Narkotin und Narzein unterscheiden.

Im Jahre 1803 isolierte Friedrich Sertürner als erster ein Opiumalkaloid, Morphin (= Morphin), welches etwa 10% des Trockengewichts von Opium ausmacht. Mitte des 19. Jahrhunderts war Morphin in der Medizin weit verbreitet. Seine Anwendung war jedoch durch seine Toxizität und sein Suchtpotential begrenzt. Deswegen versuchte man morphinähnliche Analgetika ohne oder mit nur geringem Suchtpotential zu finden, ein Problem, das bis heute in weitem Ausmaße ungeklärt geblieben ist.

Erst 1925 konnte die chemische Struktur des Morphinmoleküls von Robinson und Gulland aufgeklärt werden (Abb. 1). In den folgenden Jahrzehnten wurden halb- und vollsynthetische Morphinderivate entwickelt, bei denen je nach Veränderung am Molekül die analgetische, antitussive, halluzinatorische, kataleptische oder obstipierende Wirkung in den Vordergrund tritt. Kleine Veränderungen können aber auch zu einer teilantagonistischen Wirkung oder zur vollständigen Aufhebung der Morphinwirkung führen, wie z.B. bei dem reinen Opiatantagonisten Naloxon (N-allyl-hydroxidihydromorphinon).

Sufentanil



Morphin

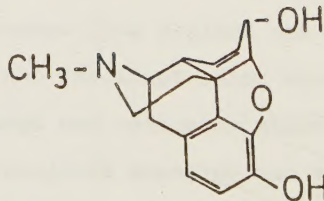


Abb. 1

Sättigung der Doppelbindung zwischen C₇ und C₈ ergibt Dihydromorphin.

Heute unterscheidet man die verschiedenen Opiate aufgrund ihrer chemischen Struktur: Morphin und Derivate (Codein, Levorphanol), Benzomorphane (Ketozyklazocin, Pentazocin), Oripavinderivate (Etorphin, Diprenorphin), Diphenylpropylaminderivate (Methadon) und Phenylpiperidinderivate (Sufentanil, Fentanyl). Viele Opiate sind optisch aktiv, wobei meist nur eines dieser Enantiomeren pharmakologische Wirkung zeigt, in vielen Fällen das linksdrehende (-) Enantiomer (87).

In vorliegender Arbeit wird die Bindungscharakteristik von Sufentanil (SUF) mit der anderer Opioiden, insbesondere Dihydromorphin (DHM), verglichen. DHM wird verwendet, weil es sich wesentlich leichter als Morphin radioaktiv markieren läßt, wobei die Wirkung jedoch der von Morphin sehr ähnlich bleibt.

Das 4-Phenylpiperidinderivat SUF (60,95) zeigt im Tierversuch eine gegenüber Morphin etwa 5000fach stärkere analgetische Wirkung. Seine Wirkung tritt sehr schnell ein, klingt jedoch schneller ab als die von Morphin. Darüber hinaus besitzt SUF eine ungewöhnlich große therapeutische Breite. SUF weist auch eine sehr starke Lipophilie auf (26,56,94). Es wird bis jetzt nur zu Forschungszwecken verwendet.

1.2. Opiatrezeptoren

Schon Anfang dieses Jahrhunderts postulierte Langley aufgrund seiner Untersuchungen mit Nikotin und Curare die Hypothese einer "receptive substance". Zur gleichen Zeit versuchte Paul Ehrlich die unterschiedliche Toxizität einiger Chemotherapeutika mit Hilfe bestimmter chemischer Gruppen im Protoplasma, die er "Rezeptoren" nannte, zu erklären. Im Laufe der Jahrzehnte wurde der Begriff Rezeptor zum grundlegenden Erklärungsmodell verschiedener physiologischer und pharmakologischer Vorgänge. Bisher gelang es erst bei wenigen Rezeptoren sie als Proteine oder Nukleinsäuren zu identifizieren (siehe Goldstein (35)). Es sollte in diesem Zusammenhang erwähnt werden, daß der Ausdruck Rezeptor, wie man ihn in der Pharmakologie versteht, als eine makromolekulare Einheit definiert ist, die sowohl die Möglichkeit besitzt, einen Liganden zu binden als auch die Fähigkeit hat, eine pharmakologische Antwort zu initiieren. Verschiedene Beobachtungen lieferten schon seit langem den Hinweis, daß auch Opiate mit ganz spezifischen Haftstellen des Nervensystems interagieren, den Opiatrezeptoren.

Opiate üben nämlich bereits in sehr geringen Dosen ihre spezifischen Wirkungen, wie z.B. Analgesie, Atemdepression oder Änderung des Bewußtseins (Euphorie) aus, und diese Effekte können durch spezifische Antagonisten, wie Naloxon, aufgehoben werden.

Wie schon erwähnt, wurde seit langem die Hypothese vertreten, daß auch Opiate ihre Wirkung über Rezeptoren ausüben. Es gelang jedoch erst 1971 Goldstein und Mitarbeitern, basierend auf dem Prinzip der Stereoselektivität, einen möglichen Weg zur Demonstration der Bindung von Opiaten aufzuzeigen¹⁾ (34). Zwei Jahre später konnte dann die hochaffine Bindung von radioaktiv markierten Opiaten an spezifischen Haftstellen in Membranpräparationen fast gleichzeitig von drei unabhängigen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (61,84,92). Nachfolgende Arbeiten auf diesem Gebiet ergänzten und bestätigten die These, daß es sich bei dieser demonstrierten Bindung um Opiatbindung an einen spezifischen Rezeptor handelt: 1.) die Bindung erwies sich als sättigbar und reversibel; 2.) die ermittelten Affinitäten korrespondierten mit den in vivo erreichten Konzentrationen; 3.) Opiatbindung konnte nur im Nervengewebe demonstriert werden und nicht in Geweben wie z.B. Lebergewebe oder Hefe; 4.) Opiatbindung war temperatur- und pH-abhängig. Bis heute wird der Opiatrezeptor hauptsächlich durch seine Interaktion mit verschiedenen Liganden beschrieben, eine vollständige Isolierung oder Strukturaufklärung dieses Rezeptors ist noch nicht gelungen. Es finden sich jedoch Hinweise, daß der Opiatrezeptor eine Glykoproteinstruktur besitzt (32).

1) Stereospezifität ist zwar ein wichtiges Kriterium zur Identifikation einer Bindungsstelle als Rezeptor, jedoch konnte für Opiate auch stereoselektive Bindung an Glasfaserfilter, Cellulose u.ä. nachgewiesen werden (63).

1.3. Endorphine und opiatähnlich wirkende Peptide

Nachdem im ZNS hoch spezifische Opiatbindungsstellen demonstriert werden konnten, schien es unwahrscheinlich, daß der Organismus diese Bindungsstellen für rein exogene Substanzen besitzen sollte. Es begann daraufhin eine intensive Suche nach den möglichen endogenen Liganden der Opiatrezeptoren.

1975 gelang es mehreren Arbeitsgruppen morphinähnlich wirkendes Material aus Gehirn und Hypophyse zu isolieren. Hughes et al. konnten als erste opiatähnlich wirkende Pentapeptide, die sogenannten "Enkephaline" aus dem Gehirn extrahieren und in ihrer Struktur aufklären (42). Sie wurden Leuzin- und Methionin-Enkephalin genannt:



Andere Arbeitsgruppen zeigten bald daraufhin, daß es im Organismus neben den Enkephalinen auch längerkettige Peptide gibt, die Opiatwirkung besitzen. Für die endogenen Peptide mit opiatähnlicher Wirkung wird heute allgemein der Begriff Endorphine verwendet. Im folgenden wurden weitere Peptide mit opiatartiger Wirkung beschrieben, wie z.B. β -Endorphin und Dynorphin, die man in Gehirn, Dünndarm und Hypophyse fand (zu detaillierterer Information vgl. A. Herz, Developments in Opiate Research) (93). Es handelt sich also um eine Vielzahl von sehr unterschiedlichen

Peptiden. Als Synthesevorstufen der opiatartig wirkenden Peptide kennt man mittlerweile drei verschiedene Moleküle, Pro-Opiomelanocortin als gemeinsame Synthesevorstufe von β -Endorphin und ACTH, Pro-Enkephalin A u.a. für Met- und Leu-Enkephalin, Pro-Enkephalin B für Leu-Enkephalin, Dynorphin₁₋₁₇ und α -Neo-Endorphin (40).

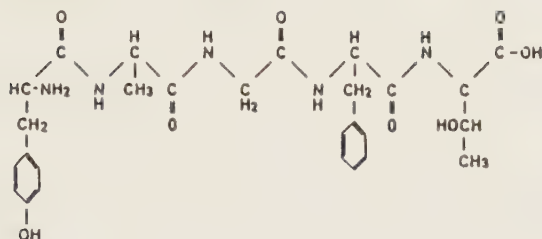
Die physiologischen Rollen, welche die endogenen Liganden des Opiatrezeptors spielen, sind weitgehend noch ungeklärt. In pharmakologischen Tests besitzen die Endorphine und Enkephaline teils morphinähnliche Wirkung wie z.B. Analgesie (2,6).

Enkephaline kann man aufgrund ihrer Wirkung an der Nervenzelle evtl. zu den inhibitorischen Neurotransmittern zählen. Andere Endorphine stehen in Beziehung zum autonomen Nervensystem, sie beeinflussen z.B. Schlaf, Appetit, Körpertemperatur und Kreislauf. Dem β -Endorphin scheint eine Rolle im Stress und im Schock zuzukommen (36). Darüber hinaus besitzt es hormonartige Wirkung. Es konnten Zusammenhänge zur Freisetzung von Prolaktin und Wachstumshormon festgestellt werden. β -Endorphin und Dynorphin besitzen Einfluß auf das luteinisierende Hormon (83). Dynorphin scheint u.a. an der Freisetzung von Vasopressin beteiligt zu sein und wirkt somit bei der Regulation des Wasserhaushaltes mit (43).

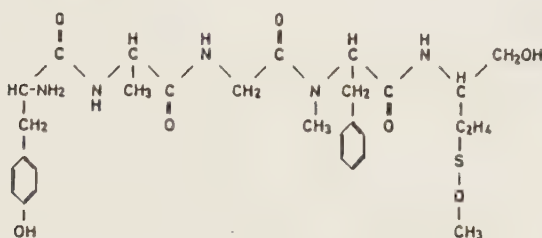
Obwohl man sich kaum vorstellen konnte, daß der Körper gegenüber seinen eigenen Substanzen Abhängigkeit und Toleranz entwickeln könnte, verhielten sich die Enkephaline und Endorphine auf diesem Gebiet ähnlich wie die klassischen Opiate. Bei wiederholter Zufuhr von Endorphinen konnte mit Naloxon ein hohes Maß an Abhängigkeit und Toleranz demonstriert werden (8). Dies gilt nicht nur für die natürlich vorkommenden Endorphine und Enkephaline sondern auch für synthetische Peptide mit opiatartiger Wirkung.

Da Leu- und Met-Enkephalin sehr schnell enzymatisch abgebaut werden, versuchte man, stabile Enkephalinanaloge zu synthetisieren. Dies gelang vor allem durch Einführung verschiedener nicht physiologisch vorkommender D-Aminosäuren. Ersetzt man Glyzin an Stelle 2 durch D-Alanin und an Stelle 5 L-Leuzin durch D-Leuzin, so erhält man das stabilere und daher wirksamere D-Ala²-D-Leu⁵-Enkephalin (4). Weitere synthetische Enkephalin-Derivate wie z.B. DAGO (D-Ala²-MePhe⁴-Glyol⁵-Enkephalin) (71) und Sandoz FK 33 824 (D-Ala²-MePhe⁴-Met-(o)-ol-Enkephalin) (73) wurden in der Folgezeit entwickelt. Ein anderes, nicht mit den bisher erwähnten Endorphinen verwandtes Opiat ist das synthetische Peptid NH₂-Tyr-Pro-Phe-Pro-CO-NH₂ (Morphiceptin), ein Derivat des β -Casomorphins (11,19) (Abb. 2).

D-Ala²-D-Leu⁵ Enkephalin



FK 33 824



Morphiceptin

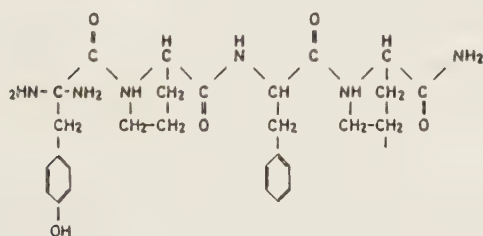


Abb. 2

Strukturformeln einiger stabilisierter Opioid-Peptide.

1.4. Multiple Opiatrezeptoren

Aufgrund unterschiedlicher Effekte verschiedener Opiate stellte Martin schon Mitte der sechziger Jahre die These eines Opiatrezeptordualismus auf (52,67). Aus seinen Untersuchungen am chronisch spinalisierten Hund entwickelte er 1976 das Konzept multipler Opiatrezeptoren (29,53, 67). Die Beobachtung, daß einige opiatartig wirkende Substanzen sehr verschiedenartige pharmakologische Wirkungen zeigen, veranlaßte Martin einen μ -Rezeptor mit hoher Selektivität für Morphin, einen κ -Rezeptor für Ketozyklazocin und einen σ -Rezeptor mit dem Protoliganden SKF 10 047 zu postulieren. Eine weitere Unterstützung der These multipler Opiatrezeptoren war die Tatsache, daß die opiatartig analgetisch wirksamen Benzomorphone im morphinabhängigen Hund die Entzugssymptome nicht bessern. Andererseits besitzen Benzomorphone selbst, ähnlich dem Morphin, ein Abhängigkeitspotential.

Zur Opiatrezeptorcharakterisierung verwendet man heute vor allem zwei unterschiedliche Versuchsanordnungen, die sich in ihrer Aussage ergänzen. Die Effektorseite einer Rezeptoreinheit kann sehr gut mit Hilfe von isolierten Organpräparationen wie dem Meerschweinchenileum und dem Samenstrang der Maus untersucht werden. Opioide unterdrücken die elektrisch stimulierten Muskelkontraktionen in den genannten Organpräparationen. Diese Effekte können

durch Opiatantagonisten aufgehoben werden.

Die Akzeptorseite einer Rezeptoreinheit kann mit Bindungsstudien mittels hochradioaktiv markierter Substanzen demonstriert und charakterisiert werden.

Aufgrund ihrer Beobachtungen an isolierten peripheren Organen konnten Kosterlitz und Mitarbeiter das von Martin vorgeschlagene Konzept bestätigen und erweitern. Sie beobachteten, daß Enkephaline eine sehr hohe Wirkung am MVD besitzen und bezeichneten diesen Rezeptortyp als δ -Rezeptor, wogegen klassische Opiate wie Morphin stärker am Ileum des Meerschweinchens wirksam sind, am sogenannten μ -Rezeptor (50,76). In Analogie dazu ergaben Bindungsstudien in Ratten- und Meerschweinchenhirn, daß radioaktive Opiat-Alkaloide besser durch Opiat-Alkaloide als durch Enkephaline und radioaktiv markierte Enkephaline besser durch Enkephaline verdrängt werden. Interessanterweise gibt es aber Peptide, z.B. Enkephalinamide und β -Endorphin, welche beide Substanzen gleich gut aus deren Bindung verdrängen (14,23,51). Auch werden Rezeptoren, zu denen eine bestimmte Art von Opioiden eine höhere Affinität besitzt (Enkephaline oder Alkaloide) gegenüber alkylierenden Substanzen wie Phenoxybenzamin und N-äthylmaleinimid durch ihre zugehörigen Liganden besser geschützt als durch Opioiden der anderen Gruppe (72,86). Die Charakterisierung verschiedener Opiatrezeptortypen wurde dadurch erleichtert,

daß in bestimmten Geweben nur die Bindung von gewissen opiatartig wirkenden Substanzen demonstriert werden konnte. So findet man z.B. im Thalamus nur Bindung an sog. μ -Rezeptoren und in Zellkulturen, an Neuroblastoma x Gliomazellen, konnte nur Bindung an den δ -Rezeptor demonstriert werden (14,15). Eine Charakterisierung der μ - und δ -Opiatbindungsstellen ergab, daß die multiplen Rezeptortypen unterschiedlich auf Nukleotide und Ionen reagieren. Wie schon früher nachgewiesen, reduziert Natrium die Bindung von Opiatagonisten, während die Bindung von Antagonisten weitgehend unbeeinflusst bleibt (64,74). Ähnliche Effekte, nämlich eine Abnahme der Bindungen von Agonisten, wurden bei Zusatz von GTP beobachtet (9,24). Es wurde gezeigt, daß der Einfluß von Natrium und GTP stärker bei μ -Rezeptoren als bei δ -Rezeptoren ausgeprägt ist (18,76,81,82).

Da bis jetzt noch kein selektiver Ligand für den von Martin vorgeschlagenen κ -Rezeptor nachweisbar ist, konnte bis vor kurzem kein Beweis für eine spezifische κ -Rezeptorbindungsstelle im ZNS geliefert werden (37,39,98). Mit Hilfe neuer Methoden und Analysen gelang es dann, die Bindung an den κ -Rezeptor im ZNS zu demonstrieren. Es finden sich Hinweise, daß als endogener Ligand für diesen Rezeptor Dynorphin fungieren könnte (20,21,47,68,100). Weitere, bisher weniger gut untersuchte Rezeptortypen sind der ϵ - und σ -Opiatrezeptor.

Im Samenstrang von Ratten, an dem Enkephalin und Opiat-Alkaloide keine Wirkung zeigen, besitzt β -Endorphin eine hohe opiatartige Wirkung ähnlich wie in den klassischen Organpräparationen, dem isolierten Ductus deferens der Maus und dem Meerschweinchenileum. Diese Beobachtung veranlaßte die Annahme eines ϵ -Rezeptors (98).

Es finden sich auch Anhaltspunkte in der Literatur, die für die Existenz des ursprünglich von Martin vorgeschlagenen σ -Rezeptors sprechen (59). Der σ -Rezeptor ist aber nur bedingt als Opiatrezeptor anzusehen, da es fraglich ist, ob die Effekte von SKF 10 047 durch Naloxon antagonisierbar sind.

Die Einteilung der Opiatrezeptoren in μ -, δ - und κ -Rezeptoren wird dadurch erschwert, daß es Hinweise gibt, daß auch diese Rezeptorpopulationen in sich heterogen sein könnten. Untersuchungen an peripheren opiatempfindlichen Geweben stützen diese These (101). Zur Zeit läßt sich die Opiatrezeptorpopulation einteilen wie in Tabelle 1 dargestellt.

Den verschiedenen Opiatrezeptortypen ganz bestimmte pharmakologische Effekte zuzuordnen ist zur Zeit nicht möglich. Anhaltspunkte sprechen dafür, daß Analgesie im ZNS vorwiegend über μ -Rezeptoren vermittelt wird (16). Bestimmte Liganden des κ -Rezeptors, wie die Benzomorphone,

Tabelle 1

Beschriebene Opiatrezeptoren

Rezeptortyp	charakteristischer Ligand	nachzuweisen in
μ	Morphin, SUF	ZNS, Meerschweinchenileum
δ	Enkephaline, DADL	ZNS, MVD, Neuroblastomazellen
κ	Ketozyklazocin, Dynorphin	ZNS, MVD, Meerschweinchenileum, Samenstrang des Kaninchens
ϵ	β -Endorphin	Samenstrang der Ratte
(σ)	SKF 10 047	ZNS)

rufen im Menschen Dysphorie hervor, wogegen nach Morphin, dem Liganden des μ -Rezeptors, Euphorie beobachtet wird. Der δ -Rezeptor wird mit Funktionen des autonomen Nervensystems in Zusammenhang gebracht. Jedoch ist eine eindeutige Korrelation definierbarer pharmakologischer Wirkungen mit ganz bestimmten Rezeptortypen nicht möglich, da auch einzelne Rezeptortypen zusammen in der Nervenzellmembran existieren können und qualitativ gleiche Effekte bewirken.

Das Konzept der Existenz multipler Opiatrezeptoren wird heute allgemein anerkannt. Dabei sprechen die meisten Untersuchungen dafür, daß es sich um eigenständige Rezeptorstrukturen handelt. Es ist allerdings eher unwahrscheinlich,

daß, wie früher vorgeschlagen, verschiedene Erkennungsstellen an einem einzigen Rezeptormakromolekül unterschiedlich mit verschiedenen Opiatliganden interagieren (70). Neuere Hypothesen nehmen an, daß verschiedene Opiatbindungsstellen durch andere Komponenten der Neuronenmembran reguliert werden (10). Es kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden, daß die Multiplizität nur aufgrund unterschiedlicher physiologischer Aktivierung besteht.

1.5. Problemstellung

Mit Hilfe der Methode der selektiven Toleranzentwicklung am Vas deferens der Maus (78,81,101) konnte nachgewiesen werden, daß zwischen Substanzen, die bisher gemeinsam als κ -Liganden klassifiziert wurden, eine vollständige Kreuztoleranz fehlt (81). Unter ähnlichen Gesichtspunkten wurden dann auch einige strukturell sehr unterschiedliche μ -Liganden, wie SUF, Normorphin und FK 33 824, getestet. Erstaunlicherweise ergibt ein hohes Maß an Toleranz gegenüber den μ -Agonisten SUF nur einen sehr geringen Grad an Kreuztoleranz gegenüber den beiden anderen μ -Liganden Normorphin und FK 33 824 (Abb. 3). Diese Befunde wurden so interpretiert, daß möglicherweise die μ -Rezeptorpopulation im Vas deferens der Maus nicht einheitlich ist (82).

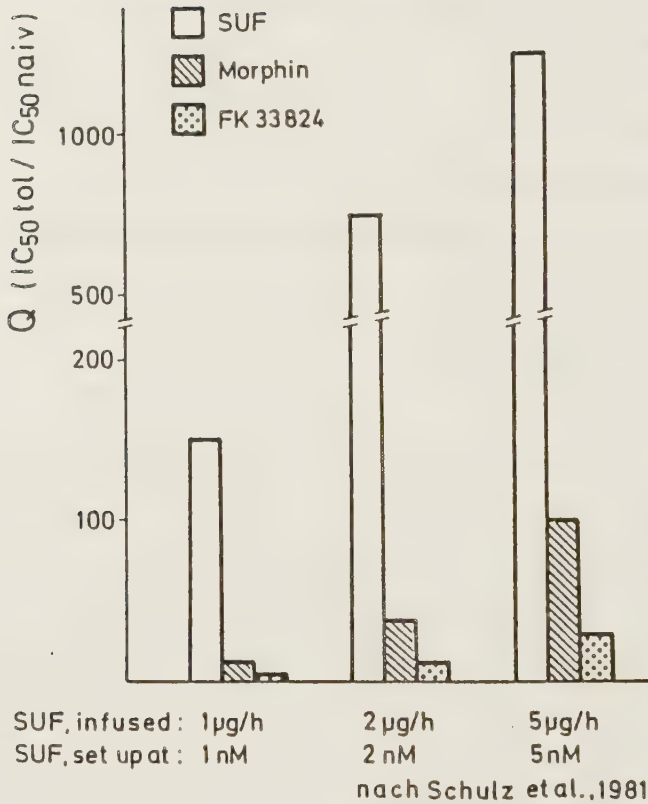


Abb. 3

Toleranz und Kreuztoleranz zwischen Sufentanil, Normorphin und FK 33 824 am isolierten Samenleiter der Maus. Mäuse wurden für 6 Tage mit Sufentanil behandelt wie auf der Abszisse angegeben. Die Samenleiter wurden präpariert und in-vitro mit der angegebenen Sufentanil-Konzentration im Organbad auf ihre Kreuztoleranz zu den anderen μ -selektiven Opioiden untersucht. Die Höhe der Säulen (Q) bezeichnet den Grad an Toleranz, der aus der Verschiebung der Dosen-Wirkungskurve ermittelt wurde.

Im Vergleich der Bindungscharakteristiken der beiden bisher als typische μ -Agonisten beschriebenen Substanzen SUF und DHM sollte herausgefunden werden ob sie, ähnlich den Befunden am peripheren Gewebe, mit Subtypen des μ -Opiatrezeptors im ZNS interagieren.

2. METHODIK UND VORGEHENSWEISE

2.1. Theorie der Bindungsstudien

Radioaktiv markierte Agonisten oder Antagonisten können in Bindungsstudien als Liganden benutzt werden um die Erkennungsseiten von Rezeptoren zu charakterisieren. Dafür sind radioaktiv markierte Substanzen von hoher spezifischer Aktivität nötig, da nur solche in sehr geringen Konzentrationen angewendet werden können. Tritiierte Substanzen werden als radioaktiv markierte Liganden den jodierten vorgezogen, da sie von der nativen Substanz biologisch nicht zu unterscheiden sind und sich daher in ihrer Interaktion mit den Rezeptoren wie der nicht markierte Ligand verhalten (5). Um nun eine Bindungsstelle als Rezeptor charakterisieren zu können, sollten die unter 1.2. beschriebenen Voraussetzungen gegeben sein (vgl. S. 5).

Das Prinzip der Bindungsstudien beruht darauf, daß die Anzahl der Bindungsstellen in einer Präparation begrenzt ist, damit ist die Menge, welche spezifisch an einen Rezeptor bindet, limitiert und in einem bestimmten Bereich linear abhängig von der Menge an insgesamt vorhandener Substanz (27). Sättigbarkeit ist somit ein unabdingbares Kriterium der spezifischen Bindung (13). Die Bindung einer Substanz am Rezeptor kann normalerweise nicht direkt demonstriert werden. Es wird vielmehr die

Bindung an einer Membranpräparation untersucht. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, daß der jeweilige Ligand auf verschiedene Arten bindet: Neben der spezifischen Bindung am Rezeptor existiert ein anderer Typ Bindung, der nicht sättigbar ist und als "unspezifische" Bindung bezeichnet wird. Die Höhe der unspezifischen Bindung muß für jedes Experiment gesondert ermittelt werden, indem in Anwesenheit des radioaktiv markierten Liganden ein Überschuß an nicht markierten Liganden ($C_{\text{Ligand}}^{\text{unmarkiert}} \geq 100 \cdot K_D$) zugesetzt wird. Durch den hohen Überschuß an unmarkierten Liganden wird der gebundene radioaktiv markierte Ligand vollständig aus seiner spezifischen (sättigbaren) Bindung verdrängt. Der dann festgestellte Wert an radioaktiver Substanz in Gewebe und Filter stellt ein Maß für die unspezifische Bindung dar und muß von den ermittelten Werten subtrahiert werden (5,54).

Die spezifische Bindung folgt im wesentlichen einer Kinetik, wie sie durch die Michaelis-Menton-Gleichung für die klassische Enzym-Substratkinetik beschrieben wird. Basierend auf dem Massenwirkungsgesetz, läßt sich dies für die Interaktion eines Liganden mit dem Rezeptor folgendermaßen beschreiben (27,103):

$$1) \quad a(R) + b(L) \frac{k_1}{k_{-1}} = c(RL)$$

wobei (R) die Konzentration der nicht besetzten Bindungsstellen, (L) die Konzentration des freien Liganden und (RL)

die Konzentration des Rezeptor-Ligandenkomplexes ist. k_1 ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Assoziation und k_{-1} ein Maß für die Geschwindigkeit der Dissoziation (a , b und c sind Konstante).

Im Gleichgewicht gilt:

$$2) \quad k_1 (R)^a \cdot (L)^b = k_{-1} (RL)^c$$

Für die Gleichgewichtskonstante, entweder ausgedrückt als Assoziationskonstante oder deren reziproken Wert, als Dissoziationskonstante, ergibt sich:

$$3) \quad K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} \cdot \frac{(R)^a (L)^b}{(RL)^c}$$

Für die Bindungsspezifität ist neben der Affinität des Liganden zur Bindungsstelle (= hochaffine Bindung) die Sättigbarkeit der Bindung ein anderes Kriterium. Im gesättigten Zustand ist die maximale Anzahl an Bindungsstellen begrenzt, was im folgenden durch die Bezeichnung $B_{\max}$ zum Ausdruck gebracht werden soll.

$$4) \quad B_{\max} = (RL) + (R)$$

$$\text{oder} \quad B_{\max} \cdot (L) = ((RL) + (R)) \cdot (L)$$

Setzt man diesen Ausdruck in Gleichung 3 ein, wobei $a = b = c$, so folgt:

$$5) \quad (RL) \cdot (L) + (RL) \cdot K_D = B_{\max} \cdot (L)$$

$$6) \quad (RL) \cdot ((L) + K_D) = B_{\max} \cdot (L)$$

$$7) \quad (RL) = \frac{B_{\max} \cdot (L)}{(L) + K_D}$$

Setzt man nun für (RL) B, gebundener Ligand, und für (L) F, freier Ligand, ergibt sich:

$$8) \quad B = \frac{B_{\max} \cdot F}{F + K_D} \quad \text{oder} \quad BF + BK_D = B_{\max} \cdot F$$

Gleichung 8 dividiert durch die bekannte Größe F:

$$9) \quad B + \frac{B}{F} \cdot K_D = B_{\max}$$

$$10) \quad \text{oder} \quad \frac{B}{F} = \frac{B_{\max} - B}{K_D}$$

Gleichung 10 stellt die klassische Scatchardgleichung dar (77).

Datenauswertung mittels der Gleichung nach Scatchard

Um diese Darstellungsmethode experimentell einfach anwenden zu können, wird eine bestimmte Konzentration an Gewebe (in diesem Fall eine 1%-Gehirn-Puffer-Suspension), mit steigenden Konzentrationen des radioaktiv markierten Liganden versetzt und die Menge, die spezifisch gebunden wird, entsprechend dieser Gleichung ermittelt und in einer

linearen Darstellung aufgezeichnet. Der Hauptvorteil der Darstellung nach Scatchard liegt darin, daß allen Punkten gleiche statistische Gewichtung zukommt. Der experimentelle Fehler, der darin besteht, als Hauptvariable den gebundenen Liganden zu bestimmen, wird mathematisch von der Liniendarstellung genommen, indem die Variable auf beiden Achsen aufgetragen wird (5). Trägt man $\frac{B}{F}$ gegen B auf, so ergibt sich eine Gerade. Die Steigung dieser Geraden ist $-\frac{1}{K_D}$ und der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse bezeichnet die maximale Anzahl an Bindungsstellen ($B_{\max}$). Die besten Schätzwerte für diese Parameter erhält man, wenn die verwendeten Konzentrationen des markierten Liganden im Bereich des K_D -Wertes liegen. Bei zu niedrigen Konzentrationen werden sowohl $B_{\max}$ als K_D zu klein bestimmt, bei zu hohen Konzentrationen bestimmt man zwar $B_{\max}$ richtig, der K_D -Wert wird aber zu hoch eingeschätzt (96,103).

Besetzt nun ein Ligand mehr als eine Bindungsstelle so ergibt sich eine bi- bzw. mehrphasische Darstellung (28). Dies ist aber nur offensichtlich, wenn sich die Affinitäten des Liganden zu den verschiedenen Bindungsstellen deutlich unterscheiden. (Zu möglichen Interpretationen nicht linearer Scatchard plots vgl. Molinoff (54)).

Veränderungen des Bindungsverhaltens eines Liganden durch einen Inhibitor (12) in der Darstellung nach Scatchard (Abb. 4):

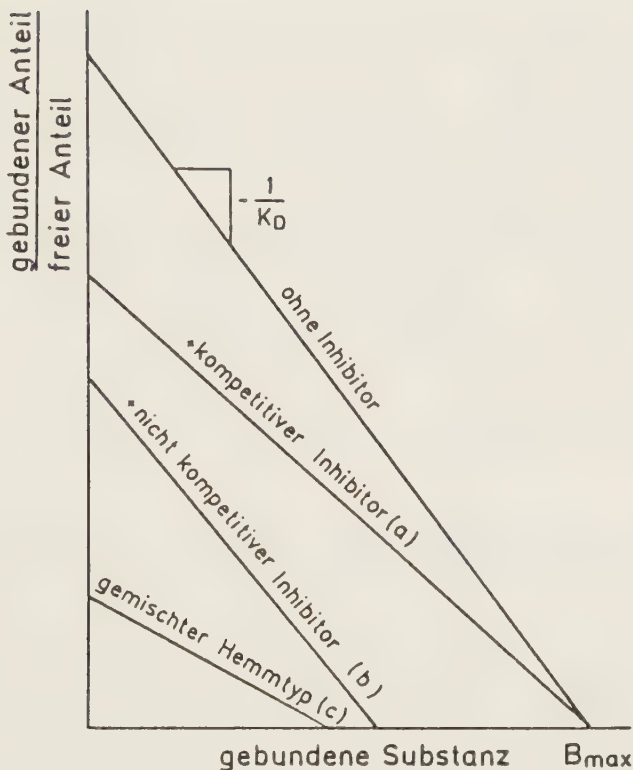


Abb. 4

Einfluß eines Inhibitors in der Darstellung nach Scatchard auf das Bindungsverhalten eines radioaktiv markierten Liganden (zur Erläuterung vgl. S. 23f)

a) Ändert sich in Anwesenheit eines Inhibitors die Steigung der Geraden nach der Gleichung $1 + \frac{(I)}{K_D}$, so handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor, wobei B_{max} unbeeinflusst bleibt.

b) Beobachtet man nur eine Verschiebung des Schnittpunktes

der Geraden mit der Abszisse nach links, ist der Inhibitor nicht kompetitiv, es resultiert also eine Reduktion der Anzahl der Bindungsseiten, ohne Veränderung des K_D -Wertes, als Maß für die Affinität.

c) Für den Fall, daß sowohl die Steigung als auch der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse verändert wird, muß ein gemischter Hemmtyp angenommen werden, d.h. es besteht sowohl ein Einfluß auf die Affinität als auch auf die Bindungskapazität.

Bindungscharakteristik mit Hilfe der Dissoziationskonstante

Eine andere Möglichkeit, das Bindungsverhalten einzelner Liganden zu charakterisieren, besteht darin, die Bindungsdissoziationskonstante von nicht radioaktiv markierten Liganden zu bestimmen. Dabei wird untersucht, in welchem Maß sich ein markierter Ligand durch steigende Konzentrationen eines nicht markierten Liganden aus seiner Bindung "verdrängen" läßt. Unter der Annahme, daß unmarkierter und markierter Ligand in gleicher Weise um die Bindungsstellen konkurrieren, ist die Konzentration des unmarkierten Liganden, bei welcher die Bindung des markierten Liganden zu 50% erniedrigt wird, ein Maß für die Dissoziationskonstante K_D der nicht markierten Substanz (5). In der Praxis muß dabei die Konzentration des radioaktiv markierten Liganden wenigstens ein Viertel kleiner sein als deren K_D -

Wert. Es ist aber oftmals nicht möglich mit einer solch geringen Konzentration an radioaktiv markierter Substanz zu arbeiten, da ansonsten die Ausbeute zu gering wäre, was zu starken Meßungenauigkeiten führen würde. Bei höheren Tracerkonzentrationen müssen die IC_{50} -Werte deshalb nach der 1973 von Cheng und Prusoff entwickelten Gleichung

$$K_D = \frac{IC_{50}}{1 + (L) \times K_D} \quad \text{korrigiert werden (22).}$$

Computer-unterstützte Datenauswertung

Um den mittels Bindungsstudien gewonnenen Verdrängungskurven mehr Information abzugewinnen, als dies durch die bloße Ermittlung von K_D - bzw. IC_{50} -Werten möglich ist, kann das von Robard und Munson entwickelte EDV Programm "Ligand" verwendet werden (55). Dieses Programm ermittelt zu gegebenen Daten die jeweils am besten passende Hypothese, wobei mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes Modelle angepaßt werden, die auf dem mathematischen Modell von $n \times$ Liganden mit $m \times$ Klassen von Bindungsstellen beruhen (25). Das nicht-lineare Computerprogramm optimiert Regressionskurven nach der Methode der kleinsten quadratischen Abweichung. Mit Hilfe des auf nicht logarithmischer Basis aufgebauten Programms wird versucht, die experimentellen Daten dem vorgegebenen Bindungsmodell anzunähern, wobei die experimentell gewonnenen Daten nach den Reziproken der Varianz gewichtet werden (67). Das Programm erlaubt die gleichzeitige

Untersuchung mehrerer Verdrängungskurven mit unterschiedlicher Kombination markierter und unmarkierter Liganden und optimiert Schätzwerte ($\pm$ Standardabweichung) für die Affinität und die Bindungskapazität. Die angegebenen Werte für die Standardabweichung wurden nach der von Rodbard und Munson vorgeschlagenen Methode berechnet (25). Die unspezifische Bindung muß zwar vorgegeben werden, wird aber durch das Programm optimiert. Die Güte eines Ein- oder Mehrbindungsseitenmodells kann aufgrund statistischer Tests (F- und RUNS-Test) beurteilt werden. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0.01$ gewählt.

2.2. Praktische Durchführung von Bindungsstudien

2.2.1. Tiere, Materialien, Geräte

Tiere:

Ratten: Sprague-Dawley, 200-300 g, Firma Jautz, Kissleg.

Meerschweinchen: Hartley, 400-550 g.

Substanzen:

Morphin HCl,

Dihydromorphin Merck, Darmstadt

Fentanylcitrat,

Sufentanil Janssen Pharmaceutica, Beerse

Naloxon HCl Endo Laboratories, Garden City

Diprenorphin Reckitt and Colman,
Kingston-upon-Hull

Ethylketozyklazocin-

Methansulfat Sterling-Winthrop Research
Institute, New York

D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin
(DADL)

β-Casomorphin₁₋₄ amid
(Morphiceptin) Bachem, Bubendorf

D-Ala²,MePhe⁴,Gly-ol⁵
(DAGO),

Met-(O)ol⁵-enkephalin
(FK 33824) Sandoz, Basel

Guanidylimidodiphosphat Boehringer, Mannheim

Szintillationsflüssigkeit

Aqua Luma Plus Baker Chemicals B.V., Deventer

Alle übrigen Substanzen stammen von der Firma E. Merck, Darmstadt.

Radioaktiv-markierte Substanzen:

^3H -Dihydromorphin	(80 Ci/mmol)	) Amersham Buchler, Braunschweig
^3H -Diprenorphin	(16 Ci/mmol)	
^3H -DADL	(25 Ci/mmol)	
^3H -Sufentanil	(15 Ci/mmol)	Janssen Pharmaceutica, Beerse
^3H -Ethylketocyclazocin	(15 Ci/mmol)	) New England Nuclear, Dreieich
^3H -Naloxon	(24 Ci/mmol)	

Die radiochemische Reinheit der Substanzen war besser als 95%.

Die Vorratslösungen der Peptide und anderen Substanzen wurden mit zweimal glasdestilliertem Wasser hergestellt und in Plastikgefäßen bei -25°C aufbewahrt. Basen wurden in destilliertem H_2O mit HCl in Lösung gebracht. Die Stocklösungen von SUF wurden in einem H_2O -Äthanolgemisch angesetzt. Das lichtempfindliche DHM wurde als Lösung in Lichtschutzflaschen gelagert. Guanidylimidodiphosphat wurde an Stelle von GTP verwendet, da es resistent gegen die Hydrolyse durch Phosphohydrolasen ist.

Geräte:

Glashomogenisator: IKA RW15 - Janke + Kunkel, Staufen

Ultra Turrax: IKA TP 18110 (10000 UPM) " "

Magnetrührer: IKA Combimag RCT " "

Filtrationsgerät: Millipore - Vetter, St. LeonRot

Filter: Whatman GFB Ø 25 mm " " "

Vakuumpumpe: Vakuubrand, RD4 - Brand, Wertheim

Schüttelinkubator: Köttermann 3047 - Köttermann, Hänigsen

Zentrifugen: Sorvall RC 5B)
Rotor Sorvall SS 34) Dupont Instruments,
Bad Nauheim

Flüssigkeitsszintillationsspektrometer: LS 7000
Beckman, München.

Die Zählansbeute des Gerätes für Tritium betrug 55%.

pH Meter: Orion Modell 601; Colora München

Glaselektrode: Bachofer, Reutlingen

Mikroliterpipetten: Eppendorf

Combipetten: Eppendorf

Mikroliterspritzen: Hamilton

Dispensette: Brand, Wertheim

Schüttelmaschine: EM 8, Bühler, Tübingen

Plastikgefäße: Zinsser und Beckman

2.2.2. Herstellung des Gewebekomogenates

Ratten und Meerschweinchen wurden durch Dekapitation mittels mechanischer Hilfsmittel getötet. Der knöcherne Schädel wurde entlang der Suturæ aufgeschnitten und das Gehirn entnommen. Das Cerebellum wurde entfernt, weil es keine Opiatrezeptoren enthält (61). Das Gehirn wurde gewogen, wobei normalerweise das Gewicht der Rattengehirne

zwischen 1,3-1,5 g und das der Meerschweinchengehirne zwischen 3,2-3,5 g lag. Konzentrationsangaben mit der Bezeichnung g Gewebe beziehen sich auf die Feuchtmasse, welche sofort nach Entnahme des Gehirns ermittelt wurde. Zur Untersuchung einzelner Gehirnnareale wurde das Gehirn nach der Methode von Glowinsky und Iversen (33) auf eisgekühltem, mit physiologischer Kochsalzlösung getränktem Tuch in die einzelnen Gebiete unterteilt.

Die Membranpräparation erfolgte ähnlich der bei Rubini et al. (76) beschriebenen Technik. In 30 ml hypotonem eisgekühlten Tris HCl Puffer (0.05 M, pH 7.4), wurde das Gehirn mit Hilfe eines Glashomogenisators (Potter Elvehjem) homogenisiert, durch zehnmaliges Auf- und Abbewegen des Gefäßes bei 750 rpm. Mit Tris HCl Puffer wurde das so erhaltene Homogenat auf eine Konzentration von 1 g Gewebe/100 ml verdünnt. Das Homogenat wurde einmal gewaschen, d.h. 20 min bei 20 000 rpm (entspricht $49\,000 \times g$) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet wurde mit Puffer zu der entsprechenden Verdünnung mit Hilfe eines Ultra Turrax bei maximaler Geschwindigkeit 15 sec lang resuspendiert. Die Membranpräparation erfolgte grundsätzlich bei 4°C , um die enzymatischen Abbauvorgänge auf ein Minimum zu reduzieren. Es wurden dabei nur vorgekühlte Glaswaren benützt.

Die mit Tris HCl Puffer gewaschenen Pellets wurden entweder sofort nach der Herstellung verwendet oder bei -25°C gelagert. Wie einige Versuche zeigten, war das Einfrieren der Pellets für wenige Tage ohne Einfluß auf das Bindungsverhalten des Gewebes.

Auf eine Bestimmung des Proteingehaltes des Homogenats wurde verzichtet, da die Rezeptordichte nicht notwendigerweise mit der Proteinkonzentration korreliert.

2.2.3. Erhebung der Bindungsdaten

Zur Erhebung der Bindungsdaten wurden grundsätzlich zwei Verfahren benutzt:

- a) 2 ml Anteile des Homogenats wurden mit steigenden Konzentrationen der radioaktiv markierten Substanz versetzt und dann die Menge an gebundener und freier Substanz bestimmt. Sollte der Einfluß einer weiteren Substanz geprüft werden, wurde entsprechend verfahren, wobei zusätzlich eine fixe Konzentration dieser Substanz zugegeben wurde. Dabei reichten die verwendeten Konzentrationen des radioaktivmarkierten Liganden von $0,03 \text{ nM}$ bis 10 nM .
- b) Fixe Konzentrationen des radioaktiv markierten Liganden wurden mit nicht markiertem Inhibitor steigender Konzentrationen ($10^{-12} \text{ M} - 10^{-5} \text{ M}$) versetzt und die Verdrängung des markierten durch den unmarkierten Liganden bestimmt. Die Konzentrationen der radioaktiv markierten Substanzen,

die für diese Bindungsstudien verwendet wurden, betrugen:

^3H -DHM: 0.5 nM; ^3H -SUF: 0.25-0.5 nM; ^3H -DADL: 1.0 nM;

^3H -DIP: 0.25 nM; ^3H -EK: 1.0 nM.

Die Bindungsstudien wurden in dreifachem, in einigen Versuchen in zweifachem Ansatz durchgeführt. 36 Proben zu jeweils 2 ml Portionen wurden 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um eine Einstellung des Gleichgewichts zu gewährleisten.

Um die freien von den gebundenen Anteilen zu trennen und zusätzlich die unspezifische Bindung zu verkleinern, wurde vor allem die Filtrationstechnik angewendet: Jede einzelne Probe wurde unter Vakuum durch Glasfaserfilter Whatman GFB filtriert und zweimal mit je 4 ml eiskaltem Tris HCl Puffer gespült. Um die gleiche Behandlung jeder Probe zu gewährleisten, wurden jeweils 36 Proben gleichzeitig in einem Vielfachfilter filtriert. Die Filtration muß schnell erfolgen, da sonst die Gefahr besteht, daß spezifisch gebundene Liganden dissoziieren und ausgewaschen werden. Die Zeit des Filtriervorganges betrug für 36 Proben nicht mehr als 2,5 min. Glasfaserfilter wurden bevorzugt verwendet, da sie eine hohe Durchflußrate gewährleisten und gleichzeitig große Mengen Gewebe auf dem Filter zurückgehalten werden (63).

Die Filterplättchen wurden in Szintillationsgefäße überführt und mit 7 ml Szintillationsflüssigkeit eine Stunde geschüttelt. Die Radioaktivität der im Gewebe gebundenen Substanz, gelöst in der Szintillationsflüssigkeit, wurde mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationspektrometers gemessen. Jede Probe wurde 5 min gezählt. Der Ausdruck erfolgte in cpm.

Wie bereits vorher dargestellt (S. 18), wird die radioaktive Substanz sowohl spezifisch wie auch unspezifisch gebunden. Ein Maß für die unspezifische Bindung stellte die Menge an Radioaktivität dar, die in Anwesenheit von 10^{-5} M unmarkierten homologen Liganden bestimmt wurde (vgl. S. 19). Die spezifische Bindung ermittelte man, indem die unspezifische Bindung von der insgesamt gebundenen Radioaktivität subtrahiert wurde. Die spezifische Bindung betrug, je nach verwendeter Substanz, zwischen 70 und 95%. Die Ergebnisse aus zwei bis vier parallelen Ansätzen wurden gemittelt. Die Daten wurden auf log-Wahrscheinlichkeitspapier aufgetragen und die graphisch ermittelten IC_{50} -Werte konnten mittels der Gleichung von Cheng und Prusoff in K_1 -Werte umgerechnet werden.

Um eine möglichst genaue Analyse des Bindungsverhaltens mit Hilfe des Computerprogramms zu gewährleisten, war es notwendig, möglichst viele Punkte für eine Verdrängungskurve zu bestimmen. Dem Programm müssen Schätzwerte für die Affinität und die Bindungskapazität vorgeschlagen

werden, die durch das Programm entsprechend der gegebenen Daten optimiert werden. Um eine noch bessere Anpassung eines Bindungsmodells zu erhalten, ist es möglich, bestimmte Werte, die im Rahmen der Untersuchung gewonnen wurden, als Konstante vorzugeben.

Für Untersuchungen zur κ -Aktivität von SUF mußte die beschriebene Vorgehensweise zum Aufstellen von Verdrängungskurven ergänzt werden. Da noch kein spezifischer κ -Ligand bekannt ist (vgl. 1.2.), wurde ^3H -DIP verwendet, das an μ -, δ - und κ -Bindungsstellen bindet, wobei die μ - und δ -Bindungsstellen mit Morphiceptin (β -Casomorphin-1-4amid) 10^{-5}M und DADL 10^{-7}M abgesättigt wurden, so daß an diesen Bindungsstellen kein ^3H -DIP mehr spezifisch gebunden werden konnte (20). Im so präparierten Homogenat kann man davon ausgehen, daß dann ^3H -DIP oder ^3H -EK (30), welche vermutlich an alle Opiatrezeptortypen binden, selektive Marker für κ -Bindungsstellen darstellen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Bindungsverhalten verschiedener μ -, δ - und κ -Liganden

Um das Bindungsverhalten von SUF im ZNS genauer zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit SUF, DHM, DADL und DIP durchgeführt, wobei SUF und DHM zu den Vertretern der μ -Agonisten gerechnet werden (48,79,80,99) und DADL zu den δ -Agonisten (14,51). DIP besetzt, wie schon erwähnt, μ -, δ - und κ -Bindungsstellen (9,14,23).

Bei der Verdrängung von ^3H -SUF durch SUF und von ^3H -DHM durch das nicht markierte DHM ergeben sich sehr ähnliche K_1 -Werte, 1,7 nM für SUF und 2,1 nM für DHM. Unmarkiertes SUF erweist sich etwas wirksamer, markiertes DHM aus dessen Bindung zu verdrängen, als markiertes SUF, wobei K_1 -Werte von 0,8 nM gegen ^3H -DHM und 1,7 nM gegen ^3H -SUF ermittelt wurden. Nicht markiertes DHM verdrängt ^3H -SUF etwa viermal schlechter als ^3H -DHM, was sich mit K_1 -Werten von 0,8 nM und 3,2 nM beschreiben läßt.

DADL besitzt eine hohe Affinität zu δ -Bindungsstellen und eine geringere Affinität zu μ -Bindungsstellen (14,31,51, 101). SUF ist ungefähr dreimal wirksamer als DHM, radioaktiv markiertes DADL zu verdrängen. Die errechneten K_1 -Werte betragen 19 und 62 nM. DADL dagegen besitzt eine etwas höhere Affinität zu den Bindungsstellen, die durch

^3H -DHM markiert werden, als zu denen, welche SUF besetzt. DHM und SUF, die beiden μ -Liganden, zeigen annähernd gleiche Affinität zu den Seiten, an die ^3H -DIP bindet, der K_1 -Wert beträgt 3,0 bzw. 5,2 nM. DIP erkennt sehr gut die Bindungsstellen, an welche ^3H -SUF und ^3H -DHM angreifen. IC_{50} ist 1,9 bzw. 0,4 nM bei der Verdrängung von ^3H -SUF und ^3H -DHM. Tabelle 2 soll die K_1 -Werte der verschiedenen Substanzen noch einmal zusammenfassen. Es läßt sich u.a. daraus ersehen, daß SUF wirksamer ist ^3H -DHM zu verdrängen, als umgekehrt. Darüber hinaus besitzt SUF im Gegensatz zu DHM auch eine höhere Affinität zu δ -Seiten, die durch ^3H -DADL besetzt werden. Andererseits verdrängt DADL ^3H -SUF um den Faktor acht schlechter aus dessen Bindung als ^3H -DHM.

Tabelle 2

Rezeptoraffinitäten von μ -, δ - und κ -Liganden (K_1 Werte nM)

	^3H -DADL	^3H -DHM	^3H -SUF	^3H -DIP
DADL	2.1 $\pm$ 0.4	221.0 $\pm$ 6.4	178.0 $\pm$ 4.1	>1000
DHM	62.0 $\pm$ 18.0	2.1 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.9	3.0 $\pm$ 1.9
SUF	19.0 $\pm$ 4.6	0.8 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 1.6
DIP	0.25 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2

Die Werte $\pm$ S.E.M. wurden aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt.

3.2. Bindungsverhalten selektiver μ -Liganden

Um das Bindungsverhalten selektiver μ -Liganden zu untersuchen, wurde getestet, inwieweit ^3H -DHM und ^3H -SUF, die beiden μ -Liganden, aus ihrer Bindung im ZNS durch einige andere, bisher als μ -Liganden beschriebene Substanzen (14,48,51,99) verdrängt werden. Hierbei wurden sowohl μ -selektive Alkaloide als auch Peptide untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 3 dargestellt. Unabhängig von der chemischen Grundstruktur weisen fast alle getesteten Substanzen sehr ähnliche Dissoziationskonstanten für die Verdrängung von ^3H -DHM und ^3H -SUF auf, wobei die K_1 -Werte im Bereich zwischen 2,2 und 6,8 nM liegen für ^3H -DHM und zwischen 3,0 nM und 10,7 nM für ^3H -SUF, d.h. die erprobten μ -Liganden verdrängen beide Substanzen gleich gut. Die Q-Werte, ein Maß für das Verhältnis der K_1 -Werte der einzelnen Substanzen gegenüber ^3H -SUF zueinander, weichen nur geringfügig voneinander ab. Einzige Ausnahme bildet das Tetrapeptid Morphiceptin, eine Substanz, die als hoch selektiver μ -Agonist beschrieben wurde (19). Darüber hinaus zeigt Morphiceptin nur eine sehr geringe Affinität zu der durch ^3H -SUF markierten Bindungsstelle, wobei ein K_1 -Wert von 586 nM ermittelt wurde. Morphiceptin verdrängt ^3H -SUF 33mal schlechter als ^3H -DHM aus deren Bindung. Morphiceptin erweist sich deutlich schwächer als die übrigen getesteten Substanzen, markiertes DHM zu verdrängen, der K_1 -Wert von Morphiceptin liegt im Bereich >10 nM.

Tabelle 3

AFFINITÄTEN μ -SELEKTIVER REZEPTORLIGANDEN ZU DEN MIT ^3H -DHM UND ^3H -SUF MARKIERTEN
BINDUNGSSTELLEN

	^3H -DHM	^3H -SUF	Q
Morphin HCl	2.2 ± 0.3	3.0 ± 0.9	1.4
Naloxon	2.4 ± 1.7	4.9 ± 0.6	0.6
Fentanyl	4.7 ± 1.9	10.7 ± 3.4	2.3
(Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂) (Dermorphin)	6.8 ± 0.8	4.1 ± 0.5	2.0
[D-Ala ² -Me-Phe ⁴ -Gly-ol ⁵]enkephalin (DAGO)	6.4 ± 3.7	5.0 ± 1.6	0.8
[D-Ala ² -Mephe ⁴ -Met(o)-ol]enkephalin (FK 33 824)	3.5 ± 0.6	4.9 ± 1.5	1.1
β -Casomorphin ₁₋₄ amid (Morphiceptin)	17.6 ± 5.1	586 ± 166	33.3

K_i -Werte in nM.

Die Werte wurden in 3 oder 4 unabhängigen Experimenten bestimmt und die Abweichung als S.E.M. angegeben.

3.3. Analyse der SUF und DHM Bindung mittels der Darstellung nach Scatchard

3.3.1. Maximale Anzahl der Bindungsstellen

Um das Bindungsverhalten der beiden μ -Liganden SUF und DHM detaillierter untersuchen zu können, wurden Analysen der Bindung nach einer von Scatchard beschriebenen Methode durchgeführt (77). Für beide Substanzen kann mit Hilfe dieser Darstellung eine lineare Regressionsgerade beschrieben werden, was für eine einheitliche hochaffine Bindungsstelle spricht. Wie aus der Abbildung 5 ersichtlich, ergibt sich für ^3H -DHM eine maximale Bindungskapazität von 10.1 ± 1.6 pmol/g Gewebe. ^3H -SUF dagegen besitzt eine etwa viermal größere Bindungskapazität als ^3H -DHM. Der Wert für die maximal besetzte Anzahl an SUF Bindungsstellen liegt bei 38.8 ± 4.8 pmol/g Gewebe. Die K_i -Werte, die Affinität der beiden μ -Liganden zu ihren Bindungsstellen, lassen sich aus der graphischen Darstellung anhand der Steigung der Geraden berechnen. Es ergibt sich für ^3H -DHM ein Wert von 2.4 ± 0.8 nM und für ^3H -SUF 1.4 ± 0.13 nM. Die so ermittelten Werte für die Affinitäten beider Substanzen entsprechen den K_i -Werten, die aus den Verdrängungskurven errechnet wurden (siehe 3.1.).

Die Bindungskapazität von SUF liegt über der der anderen radioaktiv markierten Opiode, welche im Rahmen dieser Untersuchung verwendet wurden.

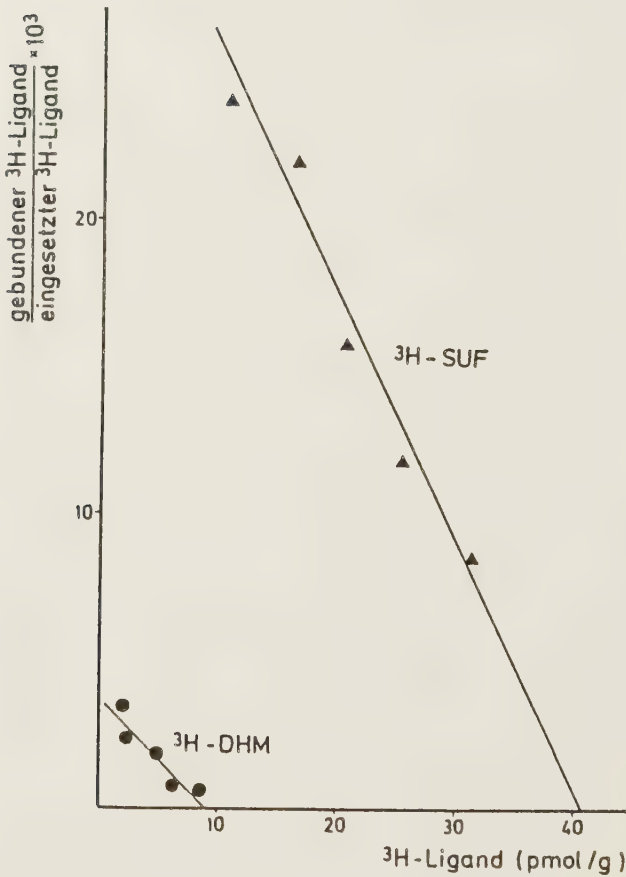


Abb. 5

Analyse der Bindungsparameter von ^3H -SUF und ^3H -DHM mittels der Darstellung nach Scatchard. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Versuch, in dem die beiden Substanzen parallel getestet wurden; der Versuch wurde 3 mal mit sehr ähnlichem Ergebnis wiederholt.

3.2. Gegenseitige Regulation der Bindung

Da SUF eine sehr viel höhere Bindungskapazität aufweist als DHM, stellt sich die Frage, wie DHM ^3H -SUF so wirksam und vollständig aus dessen Bindung zu verdrängen vermag. Untersuchungen des Bindungsverhaltens von ^3H -SUF mittels der Analyse nach Scatchard, in Anwesenheit von unmarkiertem DHM in steigender Dosierung, zeigen: In der graphischen Darstellung (Abb. 6) wird die Gerade der ^3H -SUF-Bindung in Anwesenheit von unmarkiertem DHM nach links verschoben und die Steigung wird etwas flacher im Vergleich zur graphischen Darstellung der ^3H -SUF-Bindung in Abwesenheit von DHM. Dies läßt sich folgendermaßen interpretieren: DHM reduziert sowohl die Affinität als auch die Kapazität der SUF-Bindung. In Anwesenheit von 3 nM DHM (entspricht etwa dem K_1 von DHM) findet man eine Abnahme der SUF-Bindung auf 75% der ursprünglichen Bindungskapazität sowie eine Reduktion der Affinität um etwa den Faktor 3. Eine maximale Reduktion der Bindungsseiten von ^3H -SUF, und zwar um rund 60%, ergibt sich in Anwesenheit von 7 nM DHM, die Affinität dagegen nimmt nicht mehr entsprechend ab¹⁾. Umgekehrt wurde gefunden, daß SUF ^3H -DHM rein kompetitiv verdrängt. In Anwesenheit eines anderen μ -Liganden, Naloxon, konnten ähnliche Einflüsse auf die SUF-Bindung beobachtet werden wie bei DHM (Abb. 7), wobei jedoch die Affinität selbst in Anwesenheit sehr hoher Naloxonkonzentrationen (50 nM) nur minimal verringert wurde.

1) nicht in der graphischen Darstellung

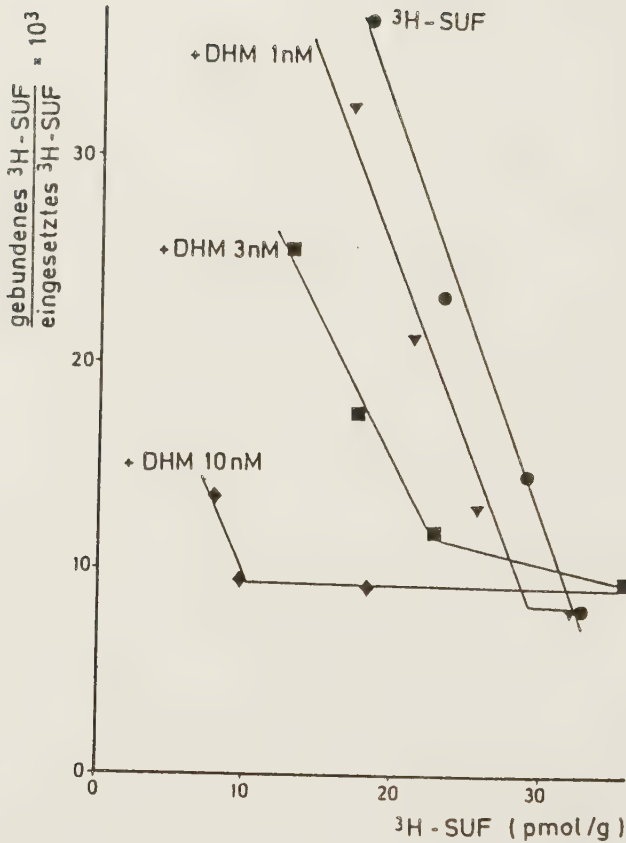


Abb. 6

Untersuchung der Bindung von $^3\text{H-SUF}$ allein (●) oder in Gegenwart von steigenden Dosen nichtradioaktiven Dihydro-morphins (DHM 1 nM ▼, 3 nM ■, 10 nM ◆). Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs, der 1 mal wiederholt wurde.

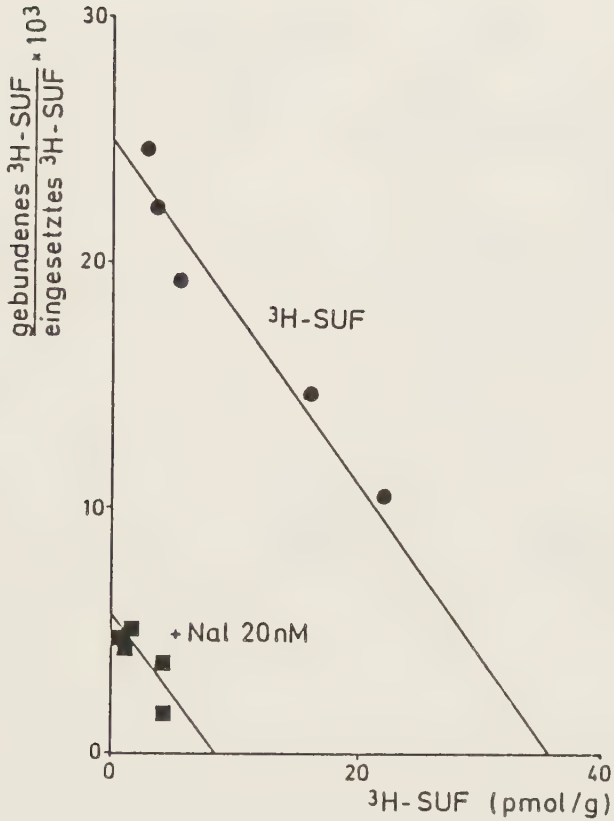


Abb. 7

Untersuchung der Bindung von $^3\text{H-SUF}$ allein (●) oder in Gegenwart von nichtradioaktiven Naloxons (■) in der Darstellung nach Scatchard.

3.4. Versuche zur Frage der möglichen κ -Affinität von SUF

Da SUF sowohl μ - als auch δ -Bindungsstellen besetzt (vgl. 3.1.), erhob sich die Frage, ob die sehr große Bindungskapazität von SUF im ZNS mit der Interaktion der Substanz mit κ -Bindungsstellen zu erklären sei.

Hierzu wurden DIP und SUF gegen ^3H -DIP getestet, wobei in diesen Versuchen die μ - und δ -Bindungsstellen mit DADL und Morphiceptin blockiert waren. Bei der Verdrängung DIP gegen ^3H -DIP unter Blockade der μ - und δ -Bindungsstellen ergibt sich eine Verringerung der Affinität von DIP zu den noch freien Bindungsstellen von 0.75 nM (ohne Blockade) auf 16.1 nM. Die Affinität von DIP zur möglichen κ -Bindungsstelle ist somit etwas geringer als zu den μ - und δ -Bindungsstellen.

SUF verdrängt ^3H -DIP kompetitiv wobei sich ein K_1 -Wert von 2.7 nM ergibt. Blockiert man wieder die μ - und δ -Bindungsstellen mit DADL und Morphiceptin, so kann man nur eine sehr geringe Affinität von SUF zu den verbleibenden κ -Bindungsstellen erkennen. Der K_1 -Wert liegt im Bereich $>10^{-7}\text{M}$. Da Morphiceptin SUF sehr schlecht aus dessen Bindung zu verdrängen vermag, wurde in weiteren Experimenten versucht, die μ -Bindungsstellen mit DHM anstelle von Morphiceptin zu besetzen. Zu den somit noch verbleibenden Bindungsstellen zeigen sowohl SUF als auch DIP eine höhere

Affinität als bei erstgenanntem Verfahren, was in Tabelle 4 dargestellt ist.

Tabelle 4

	DIP	SUF
$^3\text{H-DIP}$	0.7 ± 0.2	2.4 ± 0.1
$^3\text{H-DIP (DADL + BCM)}$	14.3 ± 4.0	> 100
$^3\text{H-DIP (DADL + DHM)}$	3.6 ± 0.4	5.2 ± 1.8
	EK	SUF
$^3\text{H EK}$	2.9 ± 0.4	1.5 ± 0.2
$^3\text{H-EK (DADL + BCM)}$	3.2 ± 2.0	> 100
$^3\text{H-EK (DADL + DHM)}$	3.0 ± 2.3	36.5 ± 6.9

Verdrängung der μ -, δ - und κ -Liganden DIP und EK durch SUF bei Blockade der δ -Bindungsstelle mit DADL (10^{-5}M) und der μ -Bindungsstelle mit Morphiceptin = δ -Casomorphin (10^{-5}M) oder DHM (10^{-8}M).

Die Ergebnisse wurden aus drei oder vier Untersuchungen in dreifachem Ansatz ermittelt.

Inkubationsbedingungen: 60 min bei 37°C .

$^3\text{H-EK}$, das ebenfalls die drei Bindungsstellen (μ , δ und κ) besetzt, wobei die Affinität zu κ -Bindungsstellen höher liegt als zu μ - und δ -Bindungsstellen, wurde ebenfalls zur selektiven Markierung von κ -Bindungsstellen benutzt, wobei die μ - und δ -Rezeptoren mit DADL und Morphiceptin oder DHM blockiert waren. Diese Versuche zeigen, daß EK im Gegensatz zu DIP keinen Unterschied in der Affinität zu den noch verbliebenen Bindungsstellen aufweist,

je nachdem, ob die μ - und δ -Seiten blockiert sind, oder nicht.

Für SUF ergeben sich ähnliche Resultate bei Verwendung von ^3H -EK wie bei ^3H -DIP, wenn die μ - und δ -Rezeptoren blockiert sind. Bei Anwendung von Morphiceptin und DADL, zur Absättigung der μ - und δ -Bindungsstellen, erkennt SUF die restlichen κ -Bindungsstellen sehr schlecht, ähnlich dem Ergebnis mit ^3H -DIP.

Für weitergehende Untersuchungen zur κ -Affinität von SUF mit Hilfe des Computeroptimierungsprogramms "Ligand" von Rodbard und Munson wurde Meerschweinchengehirn verwendet, da dieses im Vergleich zu Rattengehirn mehr κ -Rezeptoren enthalten soll (46). Mit Hilfe des Computerprogramms wurde das Bindungsverhalten von SUF, DHM, DADL, DIP und EK zu Opiatrezeptoren im ZNS des Meerschweinchens genauer analysiert. Hierbei wurde versucht, das Bindungsverhalten jedes Liganden zu den verschiedenen Opiatrezeptortypen, aufgrund heterologer und homologer Verdrängungskurven, mit Hilfe statistischer Methoden, signifikant zu beschreiben. Es wurden mit Ausnahme von ^3H -EK immer zwei homologe und zwei heterologe Verdrängungskurven miteinander analysiert. Computerschätzwerte ergeben für SUF eine große Bindungskapazität mit 55 pmol/g Gewebe und eine Affinität von 3.3 nM, für alle von dieser Substanz besetzten Bindungs-

stellen. Für den anderen μ -Liganden DHM findet man, wie aus Tabelle 5 ersichtlich, eine hochaffine Bindungsstelle mit einer Kapazität von 8.8 pmol/g Gewebe und einer Affinität von 6.5 nM. Der δ -Ligand DADL weist eine Bindungskapazität von 7.7 pmol/g Gewebe auf und besitzt dazu eine Affinität von 2.6 nM. Für DIP, das μ -, δ - und κ -Bindungsstellen besetzt, wird eine Kapazität von 31.3 pmol/g Gewebe und eine Affinität von 0.8 nM geschätzt. Ähnlich den Ergebnissen im Rattengehirn konnte mittels Computer-analysierten Kurven gezeigt werden, daß SUF δ -Bindungsstellen zu erkennen vermag. Ein "one site fit", d.h. die Annahme einer einzigen Bindungsstelle für SUF und DADL und SUF und DIP war schlechter als ein Modell, das zwei Bindungsstellen, μ und δ , für die drei Substanzen gestattete. Der Versuch eines "three site fits", eines Modells, das drei verschiedene Bindungsstellen betrachtet, erwies sich als nicht signifikant besser, das Bindungsverhalten für SUF und DADL als auch für SUF und DIP zu beschreiben. Es wurde entweder die Bindungsaffinität oder die Bindungskapazität zu einer vorgeschlagenen dritten Bindungsstelle durch das Programm als Null gesetzt, um überhaupt das Problem mathematisch bearbeiten zu können. Versucht man, konstante Werte für eine angenommene dritte Bindungsstelle von SUF vorzugeben, konnte das Programm die Daten nicht mehr einem möglichen Bindungsmodell zuordnen, d.h. eine sinnvolle Beschreibung einer 3. Bindungsstelle für SUF war auch mit Hilfe dieses Verfahrens nicht möglich.

Tabelle 5

Ki-Wert $10^{-9}M$

Kombination verschiedener Liganden	Bindungs- Kapazität Picomol/g Gewebe	DHM	SUF	DADL	DiP	EK
DHM + SUF	55.0 ± 1.9	6.5 ± 3.3	3.3 ± 0.3			
DHM + DiP	8.8 ± 1.4	3.3			0.14 ± 4	
SUF + DiP	55.0 31.3 ± 22		3.2 66 ± 198		0.36 ± 0.9 2.5 ± 1.1	
DHM + DADL	13.0 51.1 ± 1.6	3.3 62.5 ± 285		22.0 ± 76 1.5 ± 3.9		
SUF + DADL	55.0 7.7 ± 2.6		3.2 21.1 ± 136	14.7 ± 47 1336 ± 400		
DiP + DADL	30.0 8.9 ± 4.7			2.5 ± 7.1 170 ± 152	0.18 ± 0.1 2.7 ± 1.2	
SUF + EK	55.0		3.2			12.3 ± 75.7
DHM + EK	15.2 ± 0.04	3.3				3.3 ± 2.6
DiP + EK	25.6 ± 1.4					3.7 ± 0.003
DADL + EK	7.9 ± 0.46			2.8 ± 7.0		58.8 ± 260

Die Analyse des Bindungsverhaltens von DIP mit EK wie auch von SUF mit EK (μ -, δ -, κ -Ligand) erlaubte als statistisch relevantestes Modell nur einen "one site fit". Es konnte also nur eine gemeinsame Bindungsstelle ermittelt werden, die μ -Bindungsstelle. EK erkennt zwar die Bindungsstelle, an welcher SUF angreift, besitzt aber eine geringere Affinität ($K_D=12,5$ nM) dazu, als zu den möglichen μ -Bindungsstellen, die durch ^3H -DHM und ^3H -DIP markiert werden. Aus der graphischen Darstellung läßt sich erkennen, daß radioaktiv markiertes SUF sich selbst mit einer steilen Kurve verdrängt. Die Kurve von ^3H -SUF gegen EK verläuft in etwa genauso steil, nur im Mittelteil ist sie etwas weiter nach rechts verschoben, d.h. EK besitzt, wie schon erwähnt, insgesamt keine so große Affinität zur SUF Bindung. Die steilen Verdrängungskurven sprechen graphisch für nur eine Bindungsstelle. Flacher verläuft dagegen die Kurve von DIP gegen markiertes SUF, was einen Hinweis dafür bietet, daß hier der Sachverhalt mit einem Mehrbindungsseitenmodell besser beschrieben wird (vgl. Abb. 8). Die zweite Bindungsstelle scheint eine δ -Bindungsstelle zu sein, was aus den K_D -Werten für SUF und DADL zu der δ -Bindungsstelle leicht zu erkennen ist (vgl. Tabelle 5).

Mit Hilfe der verwendeten Liganden (DHM, DADL, DIP und EK) wären noch detailliertere Analysen der besetzten μ -, δ - und κ -Bindungsstellen möglich gewesen. Es war in

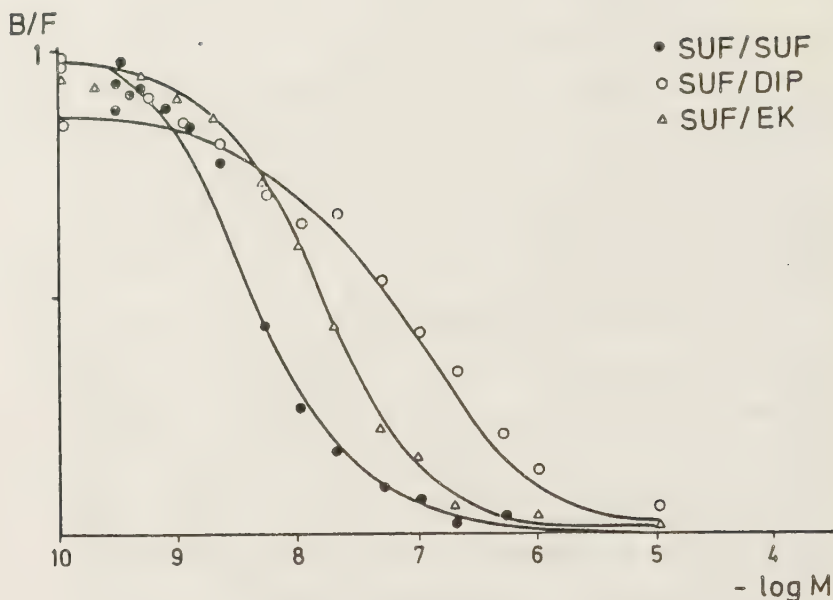


Abb. 8

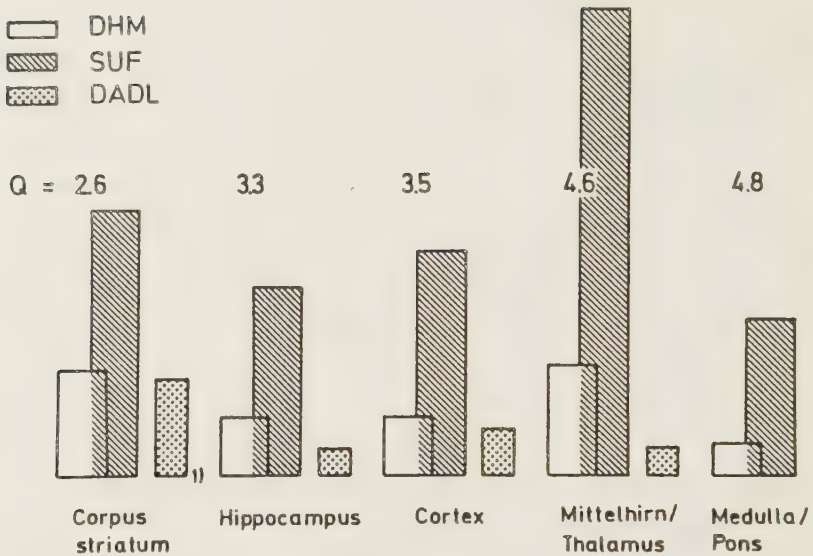
Verdrängungskurven von SUF (●) EK (△) und DIP (○) gegen markiertes ^3H -SUF. Ordinate: spezifisch gebundenes SUF
Abszisse: Konzentration des nicht markierten Liganden.
Die Kurven wurden mittels eines nicht linearen Computer-optimierungsprogramms bestimmt. Die abgebildeten Kurven sind repräsentativ. Die Experimente wurden zweimal mit sehr ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

diesem Zusammenhang jedoch nicht notwendig, die Bindungscharakteristika von DIP, DADL und EK noch weitgehender zu analysieren, da dies nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war (zur weiteren Information vgl. 66,67).

Die mit Hilfe des Computeroptimierungsprogrammes hier analysierten Daten der fünf Liganden für Opiatrezeptoren im Meerschweinchenhirn sprechen dafür, daß SUF auch in diesem Gewebe, welches einen hohen Anteil an κ -Rezeptoren besitzt, nicht mit meßbarer Affinität an κ -Rezeptoren bindet. Diese Feststellung steht in Einklang mit den vorher beschriebenen Ergebnissen nach der Methode der "sequentiellen Blockade" der μ - und δ -Rezeptoren (15).

3.5. Verteilung der Bindungsstellen von SUF und DHM in verschiedenen Gehirnarealen

Die Verteilung der Bindungsstellen von ^3H -SUF und ^3H -DHM in verschiedenen Gebieten des Rattengehirns ist in Abb. 9 dargestellt. Wie Analysen nach der von Scatchard beschriebenen Methode zeigen, ist in allen in diesem Zusammenhang untersuchten Teilen des Rattengehirns, welches nach der Methode von Glowinsky und Iversen (33) geteilt wurde, die Anzahl der SUF Bindungsstellen größer als die durch DHM markierten Bindungsstellen. Das Verhältnis der Anzahl der maximal von SUF und DHM besetzten Bindungsstellen ist jedoch unterschiedlich, was in dem Quotienten Q der Abb. 9 zum Ausdruck kommt.



1) nach Chang et al. 1979

Abb. 9

Untersuchung der Anzahl der Bindungsstellen für ^3H -DHM, ^3H -SUF und ^3H -DADL in einzelnen Gebieten des Rattengehirns. Die Daten für ^3H -DHM und ^3H -SUF wurden mittels der Analyse nach Scatchard erhoben. Die Werte für ^3H -DADL wurden der Publikation von Chang et al. 1979 (Ref. 15) entnommen.

Q gibt das Verhältnis zwischen den Bindungsstellen für ^3H -DHM und ^3H -SUF an. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die absolut höchste Bindungskapazität der DHM Bindung findet man im Corpus Striatum. In diesem Gehirnnareal ist im Vergleich zur Anzahl der DHM Bindungsstellen die Anzahl der SUF Bindungsstellen am wenigsten gesteigert. Nur etwas weniger DHM Bindungsstellen als im Striatum ergeben sich in Mittelhirn und Thalamus. Die Anzahl der Bindungsstellen für SUF ist in diesem Gehirnteil viel größer. In Mittel-

hirn und Thalamus findet man die höchste Bindungskapazität für SUF. Ähnliche Unterschiede in der Bindungskapazität ergeben sich in Medulla oblongata und Pons, jedoch ist die absolute Kapazität der Bindungsstellen in diesem Areal niedriger. Abbildung 9 berücksichtigt auch die Verteilung der DADL Bindungsstellen (Daten nach Chang et al., 1979 (15)), wobei die höchste Anzahl der DADL-Bindungsstellen im Corpus striatum zu finden ist, während Mittelhirn und Thalamus eine geringe Bindungskapazität für δ -Bindungsstellen besitzen.

3.6. Beeinflussung des Bindungsverhaltens von SUF und DHM

3.6.1. Einfluß von Ionen

Ein Vergleich der beiden Substanzen SUF und DHM in der Regulation ihrer Bindung durch das monovalente Kation Natrium zeigt bemerkenswerte Unterschiede. Bei Zugabe von NaCl (118 mM) reduziert sich die Bindungsaffinität von DHM um den Faktor 7. Wie aus der zusammenfassenden Tabelle 6 zu ersehen ist, bleibt die Bindungskapazität von DHM praktisch unbeeinflusst. Man konnte sogar eine minimale Erhöhung der Bindung nachweisen. Der Einfluß von Na^+ auf die Rezeptoraffinität von SUF ist sehr gering, wobei sich eine Reduktion der Affinität um den Faktor 1.9 ergibt.

Natrium bleibt aber nicht ohne Einfluß auf die SUF-Bindung. Scatchard-Analysen der SUF-Bindung in Anwesenheit

von Na^+ (118 mM) zeigen (vgl. Abb. 10) eine starke Verminderung der Bindungskapazitäten von SUF, wobei die Affinität von SUF durch Na^+ nur wenig beeinflusst wird. Bei Zusatz von Na^+ (118 mM) wird die Bindungskapazität von SUF gegenüber der Kontrolle in Abwesenheit von Na^+ vermindert, was auch Graphik und Tabelle 6 zum Ausdruck bringen.

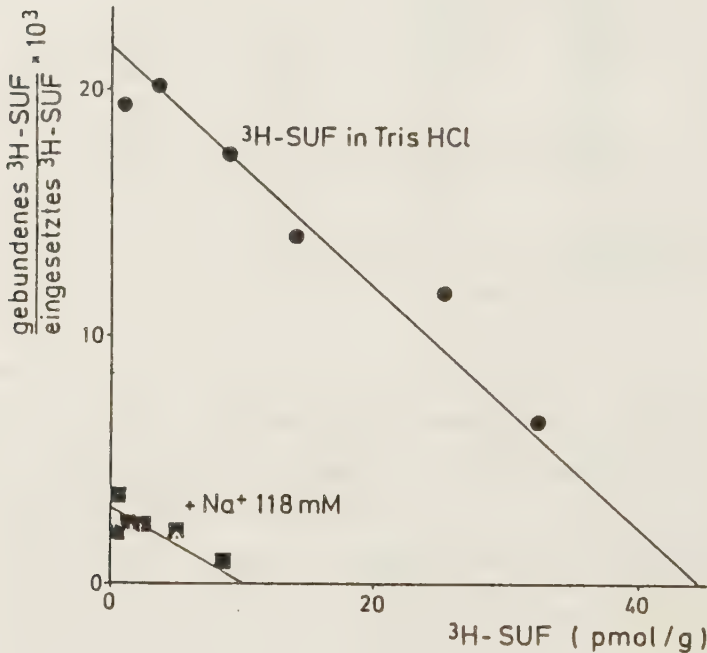


Abb. 10

Bindung von $^3\text{H-SUF}$ in Tris HCl Puffer allein (●) und in Gegenwart von Na^+ 118 mM (■) in der Darstellung nach Scatchard.

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluß des divalenten Kations Mangan auf die Bindung der beiden Opiode (μ -Liganden) SUF und DHM. Divalente Kationen, wie z.B. Mangan erhöhen die

Bindung von Opiatagonisten (57) und sollen nach neueren Untersuchungen vor allem die Bindungsaffinität der μ -Liganden erhöhen (10), was in Anwesenheit von Mangan im Homogenat für SUF und DHM auch beobachtet werden konnte. Für beide Substanzen konnte eine Erhöhung der Bindungskapazität von etwa 30% bei Zugabe von 3 mM MnCl_2 ermittelt werden. Die Bindungsaffinität wird durch die Zugabe von Mangan nicht signifikant beeinflusst.

3.6.2. Einfluß von Guanidyltriphosphat

Im weiteren wurde der Einfluß von GTP bzw. des stabilen GTP-Analogen Gpp(NH)p (50 μM) untersucht. GTP reduziert die Bindungsaffinität von DHM um etwa den Faktor 2. Die Affinität der SUF-Bindung wird dagegen kaum beeinflusst. Wie aus Tabelle 6 zu erkennen ist, ergibt sich bei Zugabe von GTP zum Homogenat eine Verringerung der SUF-Affinität von 1.4 nM (ohne GTP) auf 1.9 nM. Der Zusatz von GTP (50 μM) äußert sich in einer Reduktion der Bindungskapazität der beiden μ -Liganden SUF und DHM, wobei der Effekt bei SUF mäßig, wesentlich stärker aber bei DHM ausgeprägt ist (vgl. Tabelle 6).

Bei gleichzeitigem Zusatz von Na^+ und GTP weichen die Daten nur geringfügig von den Werten ab, die sich für die Untersuchung der einzelnen Substanzen ergeben haben. Dar-

Über hinaus konnte beobachtet werden, daß bei gleichzeitiger Zugabe von Na^+ und GTP zum Homogenat der Effekt auf die DHM-Bindung noch stärker ist als bei Zusatz von nur einer Substanz.

Tabelle 6

Einfluß von Natrium und GTP auf das Bindungsverhalten von Sufentanil und Dihydromorphin

K_1 -Werte (nM)

	<u>^3H DHM</u>	<u>^3H SUF</u>
Tris HCl	2.4	1.4
Tris HCl + Na^+ (118 mM)	14.7	2.7
Tris HCl + Gpp (NH)p (50 μM)	4.6	1.9

Bindungskapazität (Kontrollwert = 100 %)

	<u>^3H DHM</u>	<u>^3H SUF</u>
Tris HCl	100	100
Tris HCl + Na^+ (118 mM)	115	28
Tris HCl + Gpp (NH)p (50 μM)	55	84

4. DISKUSSION

Die beiden Opiatagonisten SUF und DHM wurden aufgrund ihres Verhaltens am peripheren opiatempfindlichen Gewebe, wie dem Meerschweinchenileum und dem Samenstrang der Maus als selektive μ -Liganden charakterisiert (79,100). Die beiden μ -Liganden wurden bezüglich ihres Bindungsverhaltens im ZNS untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß die beiden getesteten Substanzen SUF und DHM ähnliche K_1 -Werte besitzen und keinen bemerkenswerten Unterschied in der gegenseitigen Verdrängung aus deren Bindung aufweisen.

Bei der Verdrängung von Liganden für drei verschiedene Rezeptortypen DADL für δ , DIP für μ , δ , κ , DHM und SUF für μ ergaben sich Hinweise dafür, daß SUF etwas besser δ -Bindungsstellen erkennt als DHM. Der δ -Agonist DADL verdrängt ^3H -SUF aber etwas schlechter als er ^3H -DHM verdrängt. Folgende Untersuchungen bestätigten das Ergebnis, daß SUF im ZNS eine wesentlich geringere Affinität zum δ -Rezeptor besitzt als zum μ -Opiatrezeptor (49). Am peripheren Nervensystem konnte ebenfalls beobachtet werden, daß SUF in geringem Maße mit δ -Rezeptoren interagiert (79).

Eine genauere Untersuchung der Bindungscharakteristik von DHM und SUF mittels Analysen nach Scatchard zeigten, daß der "Standard- μ -Ligand" DHM im Vergleich zu SUF viermal weniger Bindungsstellen besetzt. Eine so erstaunlich

hohe Bindungskapazität wie von SUF wurde bis jetzt für kein anderes Opioid gefunden. Selbst DIP (eigene Untersuchung) und Etorphin (84), Substanzen, die an allen bisher beschriebenen Opiatrezeptortypen binden, weisen geringere Bindungskapazitäten auf.

Diese Beobachtung konnte nicht damit erklärt werden, daß SUF fast ausschließlich mit μ -Rezeptoren und in geringem Umfang auch mit δ -Rezeptoren reagiert. Frühere Studien am peripheren Nervensystem haben keinen Anhaltspunkt für eine mögliche κ -Aktivität von SUF geliefert (82,100). Da bis jetzt noch keine Liganden zur Verfügung stehen, die selektiv κ -Bindungsstellen besetzen, wurde versucht, mit Hilfe der von Chang (20) eingeführten Methode der sequentiellen Blockade der μ und δ Rezeptoren κ -Aktivität von SUF im ZNS zu demonstrieren. Diese Versuche ergaben jedoch keinen Hinweis für eine κ -Aktivität von SUF, was auch später von Kosterlitz, der mit einer ähnlichen Methode wie Chang arbeitete, bestätigt wurde (47).

Um eine noch genauere Analyse zur κ -Aktivität von SUF zu erhalten, wurden Bindungsdaten mittels eines Computeroptimierungsprogramms ausgewertet. Jedoch konnte mit dieser Methode selbst im Meerschweinchenhirn, welches besonders reich an κ -Rezeptoren ist (47), keine hochaffine κ -Bindungsstelle für SUF demonstriert werden.

Interessant war, das Verhalten verschiedener μ -Liganden zu charakterisieren, inwieweit sie ^3H -DHM und ^3H -SUF aus deren Bindung verdrängen. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Verhalten selektiver μ -Liganden zwischen DHM und SUF entdeckt werden. Eine Ausnahme bildet Morphin: es erwies sich 33mal stärker ^3H -DHM als ^3H -SUF zu verdrängen. Diese Feststellung kann nur so interpretiert werden: entweder muß man die Qualifizierung von Morphin als selektiven μ -Liganden in Frage stellen, oder man erklärt sich dieses Verhalten damit, daß DHM mit mehreren Bindungsseiten interagiert. Diese letztere These steht in Einklang mit dem Vorschlag von Wolozin und Pasternak, die aufgrund ihrer Ergebnisse mit DHM und DADL in mit Naloxazon vorbehandeltem Gewebe einen μ_1 und einen μ_2 Rezeptor vorschlagen (97).

Die erstaunlichen Ergebnisse, daß eine Reihe getesteter μ -Liganden ^3H -SUF vollständig und mit hoher Affinität aus dessen Bindung verdrängen, lassen sich dadurch erklären, daß diese Substanzen nicht wie vermutet rein kompetitiv mit SUF um die spezifischen Bindungsstellen konkurrieren. Eine Reduktion sowohl der Bindungskapazität als auch der Bindungsaffinität der ^3H -SUF-Bindung in Anwesenheit bestimmter Konzentrationen von DHM (vgl. Abb. 6) spricht dafür, daß ein gemischter Hemmtyp vorliegt und nicht wie ursprünglich angenommen ein rein kompetitiver Hemmtyp (siehe 2.1.). Der Regulation der SUF-Bindung durch andere selektive μ -Liganden könnte ein kooperativer Mechanismus

zugrunde liegen, dessen Mechanismus vergleichbar der allosterischen Enzymregulation sein könnte. Ähnliche Phänomene wurden schon für die Interaktion zwischen μ - und δ -Liganden beschrieben (69,75). Eine gegenseitige Beeinflussung möglicherweise allosterischer Art wurde auch für andere Rezeptoren, wie z.B. für GABA-Rezeptoren, Benzodiazepin-Rezeptoren, nicotin- und muscarinartige Rezeptoren beobachtet (7).

Vergleicht man die Dichte der SUF- Bindungsstellen mit der von DHM- Bindungsstellen in verschiedenen Arealen des ZNS der Ratte, so waren die Bindungsstellen für SUF in allen untersuchten Teilen des Gehirns zahlreicher als die für DHM. Das Verhältnis der Anzahl der beiden Bindungsstellen zueinander erwies sich jedoch als nicht konstant. Die höchste Anzahl an SUF- Bindungsstellen wurde im Mittelhirn gefunden, ein Gebiet, von dem auch Chang gezeigt hat, daß es überwiegend μ -Rezeptoren enthält (15) und das schon vor längerer Zeit als Zentrum für Analgesie beschrieben wurde (38). Dieses Ergebnis ist insofern von Interesse, da SUF eine überaus starke analgetische Wirkung besitzt und vor allem μ -Rezeptoren Analgesie vermitteln sollen.

Im Striatum, in dem die Anzahl der DHM- Bindungsstellen zwar sehr hoch ist, wo die DADL- Bindungsstellen ebenfalls zahlreich sind, besitzt SUF relativ weniger Bindungsstellen. Ein Vergleich der maximalen Bindungskapazität des μ -Liganden SUF und des δ -Liganden DADL in den einzelnen Regionen

des ZNS läßt folgendes erkennen: Die Bindungskapazität für SUF ist gerade in den Gebieten hoch, in denen augenscheinlich die Kapazität für die DADL-Bindungsstellen gering ist (vgl. Abb. 9).

Ein weiterer Unterschied im Bindungsverhalten der beiden Liganden SUF und DHM läßt sich mit Hilfe von Ionen und zyklischen Nukleotiden aufzeigen. Nach der von Pert und Snyder aufgestellten Theorie wird durch Na^+ die Bindung von Opiatagonisten verringert, die Bindung von Opiatantagonisten erhöht. Vergleicht man Agonisten und Antagonisten, ob Natrium ihre Bindungsaffinität gegenüber ^3H -Naloxon beeinflusst, so sollen Antagonisten keinen " Na^+ -shift" aufweisen, Partialantagonisten einen geringen " Na^+ -shift" und Agonisten eine deutliche Reduktion ihrer Bindung durch Natrium erfahren. Man war sogar der Meinung, man könnte allein mit Hilfe des " Na^+ -shifts" die agonistische und antagonistische Komponente einer Substanz bestimmen (63,64). Simon et al. konnten zeigen, daß die von Pert ermittelte Verringerung der Bindung unter Natriumzusatz auf eine Abnahme der Bindungsaffinität zurückzuführen ist (84). Für die DHM-Bindung konnte auch in der vorliegenden Untersuchung eine Reduktion der Affinität festgestellt werden, wobei die Bindungskapazität unbeeinflusst blieb. Dies steht weitgehend in Einklang mit den von Simon gefundenen Ergebnissen.

Neuere Untersuchungen des Natriumeffekts, die von dem Modell mehrerer Bindungsstellen ausgehen, sprechen dafür,

daß μ - im Vergleich zu δ -Agonisten einen höheren " Na^+ -shift" aufweisen (18,76). Ähnliche Effekte wurden für GTP bzw. das stabile Derivat Guanidilimidodiphosphat beobachtet (9,18,24). GTP reduziert vor allem die Bindung von Agonisten. Eine Verstärkung dieses Effekts kann erreicht werden, wenn sowohl Na^+ als auch GTP anwesend sind. Pert und Tayler differenzierten daraufhin einen Typ 1 und einen Typ 2 Opiatrezeptor, wobei Typ 1 mit Natrium regulierbar, GTP sensitiv sowie an Adenylatzyklase gekoppelt ist, während Typ 2 GTP und Na^+ unabhängig und nicht an Adenylatzyklase gekoppelt scheint (65). Für SUF konnte nach Zusatz von Na^+ und/oder GTP zum Homogenat nur eine mäßige Beeinflussung der Rezeptoraffinität festgestellt werden. Dabei wurden Quotienten ermittelt, die eher denen der Opiatantagonisten entsprechen. Pharmakologische Studien in vitro an peripheren Organen und in vivo an Mäusen, Ratten und Hunden lieferten jedoch keinen Anhaltspunkt für eine antagonistische Aktivität von SUF (26,56,91). Opiatagonisten müssen nicht unbedingt einen Natriumeffekt aufweisen. Die Bindung des reinen Opiatagonisten Lofentanil wird nicht durch Natrium beeinflusst (49). Natrium bleibt aber nicht ohne Einfluß auf die SUF-Bindung, was sich darin zeigt, daß SUF unter Natriumzusatz eine drastische Reduktion der Bindungskapazität erfährt. Die Bindung von DHM ist wie die anderer Opiatagonisten an Adenylatzyklase gekoppelt und wird durch Natrium und GTP reguliert (74). Durch Abnahme der intrazellulären Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat wird die Aktivität der Adenylatzyklase gehemmt (in Anwesenheit von GTP) (9).

Die beobachtete Verringerung der Zahl von Bindungsstellen durch Natrium und das Fehlen eines GTP-Effekts lassen vermuten, daß ein anderes Bindungs-Effektorsystem für SUF existiert, welches möglicherweise nicht an Adenylatzyklase gekoppelt ist.

Zusammenfassend kann man sagen: Die Daten aus Bindungsstudien sowohl im Ratten- als auch im Meerschweinchenhirn sprechen dafür, daß der μ -Ligand SUF mit μ -Rezeptoren interagiert, an die auch der klassische μ -Ligand DHM bindet. Zusätzlich muß die Existenz einer weiteren hochaffinen SUF-spezifischen Bindungsstelle angenommen werden, die eine sehr hohe Bindungskapazität besitzt, welche bis jetzt für kein anderes Opioid gefunden wurde. Es war jedoch trotz verschiedenartiger Versuche und Analysen nicht möglich, diese Bindungsstelle getrennt zu demonstrieren. Dies könnte verschiedene Ursachen haben: Eine Hypothese wäre, daß mehrere Moleküle SUF an einem einzigen Rezeptormolekül angreifen, was jedoch eher unwahrscheinlich ist. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die Affinität zu beiden potentiellen Bindungsstellen im gleichen Bereich liegt und sich nur bei merklicher Änderung der Affinität eine zweite Bindungsstelle darstellen läßt (5). Auch mit Hilfe des Computeroptimierungsprogramms konnte keine Differenzierung dieser beiden Bindungsstellen erreicht werden, da die SUF-Bindungsstelle wahrscheinlich an die μ -Bindungsstelle, die durch DHM charakterisiert wird, gekoppelt ist. Dafür sprechen der allosterische Mechanismus

der SUF-Bindung durch DHM¹⁾.

In verschiedenen Arealen des ZNS sind ebenfalls die Bindungsstellen in weiten Bereichen parallel den SUF-Bindungsstellen. Die durch SUF charakterisierte Bindungsstelle differenziert sich jedoch deutlich von der DHM-Bindungsstelle durch die unterschiedliche Regulation mit Na⁺ und GTP.

Beobachtungen mit SUF am Meerschweinchenileum sprechen dafür, daß SUF dort eine weit größere Wirkungsstärke ($K_D \geq 10^{-12} \text{M}$) besitzt als aus Bindungsdaten im ZNS gefolgert werden konnte. Eine Identität der Daten aus Untersuchungen am peripheren opiatempfindlichen Gewebe und den Bindungsdaten im ZNS konnte nicht demonstriert werden. Offensichtlich besteht für einige Opiode eine Diskrepanz zwischen ihrer Wirkungsstärke am isolierten Meerschweinchenileum und den Bindungsdaten wie sie in Membranpräparationen gemessen werden. Eine Dissoziation der beiden Parameter ist besonders für Phenylpiperidinstrukturen wie z.B. SUF und Lofentanil seit langem bekannt, kann aber bisher nicht befriedigend erklärt werden (44). Die Ursache mag unter anderem darin liegen, daß es mit Hilfe von Bindungsstudien nur möglich ist, die Fähigkeit einer Substanz, an einen Rezeptor zu binden (Affinität), zu beschreiben. Am isolierten Meerschweinchenileum werden jedoch zwei Parameter gleichzeitig betrachtet,

1) Das Computeroptimierungsprogramm geht von der Annahme einer rein kompetitiven Verdrängung der einzelnen Liganden untereinander aus.

die Affinität einer Substanz zum Rezeptor und die Möglichkeit, diesen Rezeptor zu aktivieren, die sog. "intrinsic activity" (3). SUF besitzt möglicherweise ein hohes Maß an "intrinsic activity".

SUF ist im intakten Tier und am isolierten Meerschweinchenileum schon in minimalen Dosierungen extrem wirksam. Andererseits besitzt es aber in Bindungsstudien eine sehr hohe Bindungskapazität. In Bindungsstudien benötigt man höhere Dosen als für den halbmaximalen pharmakologischen Effekt. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß SUF nur wenige Rezeptoren besetzen muß um einen pharmakologischen Effekt zu initiieren. Es sollte deshalb auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß SUF sog. "spare" receptors besetzt (13). Dies sind Akzeptoren, die zwar die Möglichkeit besitzen eine Substanz zu binden, deren Bindung führt aber nicht zu einem pharmakologischen Effekt.

Es scheint nicht unwahrscheinlich, daß die μ -Rezeptorpopulation in sich uneinheitlich ist. Das unterschiedliche Verhalten der beiden Liganden SUF und DHM am μ -Rezeptor im ZNS und peripheren Nervensystem läßt sich besser mit der Existenz von "Isorezeptoren" erklären (1,3). Es wurden bereits Thesen zur Existenz von "Isorezeptoren" des K-Rezeptors aufgestellt (18,79,82). Die Beobachtung, daß im SUF-toleranten Gewebe nur ein geringes Maß an Kreuztoleranz gegenüber den anderen μ -Liganden Normorphin und FK 33 824 nachzu-

weisen war, versuchte man mit der Existenz von "Iso-rezeptoren" der μ -Rezeptorpopulation zu erklären. Man ging nämlich davon aus, daß Opioide nur dann ihre Wirkung über gleiche Rezeptortypen ausüben, wenn zwischen ihnen vollständige Kreuztoleranz besteht (78).

Aus vorliegenden Untersuchungen im ZNS wie aus Ergebnissen im peripheren Nervensystem kann man schließen, daß durch SUF und DHM Bindungsstellen des μ -Rezeptors charakterisiert werden. Die μ -Rezeptorpopulation im ZNS scheint, ähnlich den Ergebnissen im peripheren Nervensystem, nicht einheitlich zu sein (82,91).

Anzumerken wäre jedoch, daß die durch DHM und SUF beschriebenen Rezeptorsubtypen nicht mit den von Wolozin und Pasternak vorgeschlagenen μ_1 und μ_2 Rezeptoren identisch sind.

Ob und in welchem Maß durch SUF pharmakologisch bedeutungsame Opiatrezeptoren besetzt werden, die nicht zu den durch DHM beschriebenen μ -Rezeptoren zählen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im zentralen wie auch im peripheren Nervensystem unterscheidet man heute verschiedene Typen von Opiatrezeptoren, u.a. einen μ - (Morphin), einen δ - (Enkephalin) und einen κ - (Ketocyklazocin) Rezeptor.

Aufgabe dieser Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit das Verhalten von Sufentanil im zentralen Nervensystem zu demjenigen im peripheren Nervensystem Ähnlichkeiten aufweist und daraus Aufschlüsse über die μ -Rezeptorpopulation im ZNS zu gewinnen.

Nachdem auch SUF in radioaktiv markierter Form erhältlich war, konnte mit Hilfe von Bindungsstudien das Verhalten dieser Substanz im ZNS untersucht werden. Vergleicht man die beiden bisher als Standard μ -Agonisten verwendeten Substanzen Sufentanil und Dihydromorphin bei der Verdrängung durch ihre nicht markierten homologen und heterologen Konkurrenten, so ergeben sich ähnliche Dissoziationskonstanten. Auch verdrängen einige bisher als μ -Liganden charakterisierte Substanzen ebenso gut ^3H -Sufentanil wie ^3H -Dihydromorphin aus deren Bindung. Einzige Ausnahme bildet Morpiceptin. Dieses, bisher als hoch μ -selektive Substanz beschriebene, Tetrapeptid konnte ^3H -DHM 30mal stärker aus dessen Bindung drängen als ^3H -SUF.

Weitere Untersuchungen ergaben zusätzliche Unterschiede im Bindungsverhalten der beiden μ -Liganden SUF und DHM:

- Die maximale Anzahl der Bindungsstellen für ^3H -SUF ist viermal größer als die für ^3H -DHM ermittelte Bindungskapazität.
- Man beobachtet eine unterschiedliche Verteilung der Bindungsstellen für ^3H -SUF und ^3H -DHM in verschiedenen Arealen des zentralen Nervensystems.
- Die Bindung von SUF und DHM wird in unterschiedlicher Weise durch Natriumionen und GTP reguliert.

Da SUF eine extrem hohe Anzahl Bindungsstellen im ZNS besitzt, wurde untersucht, ob es, im Gegensatz zum peripheren Nervensystem, im ZNS neben dem μ -Rezeptor auch an δ - und κ -Rezeptoren mit hoher Affinität bindet. Jedoch besitzt SUF nur eine mäßige Affinität zum δ -Rezeptor. Darüber hinaus konnte trotz intensiver Untersuchung kein Anhaltspunkt dafür gefunden werden, daß SUF eine relevante Affinität zu κ -Bindungsstellen im ZNS besitzt.

Bindungsanalysen von SUF in Anwesenheit von DHM wiesen darauf hin, daß diese Substanz nicht wie früher angenommen sich rein kompetitiv gegenüber SUF verhält. Die SUF Bindung wird durch μ -Agonisten wie DHM allosterisch reguliert.

Aus dem zum Teil gegensätzlichen, zum Teil einheitlichen Bindungsverhalten der beiden μ -Agonisten Sufentanil und Dihydromorphin ergibt sich folgendes: SUF reagiert mit der bisher durch DHM beschriebenen Bindungsstelle. Zusätzlich interagiert es noch mit einer anderen Opiatbindungsstelle, die nicht mit den bisher beschriebenen δ - und κ -Bindungsstellen identisch sein kann und aufgrund ihrer Charakterisierung zu den μ -Opiatrezeptoren gezählt werden sollte. Diese Beobachtung spricht dafür, daß die μ -Opiatrezeptorpopulation in sich heterogen ist.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
cpm	counts per minute
DADL	D-Ala ² -D-Leu ⁵ -Enkephalin
DHM	Dihydromorphin
DIP	Diprenorphin
EK	Ethylketozyklazocin
Gpp(NH)p	Guanidylimidodiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
IC ₅₀	Konzentration, bei der eine halbmaximale Verdrängung aus der Bindung beobachtet werden kann
K _i	Nach der Gleichung von Cheng und Prusoff korrigierte IC ₅₀ -Werte
MVD	Mouse vas deferens Ductus deferens (Samenleiter) der Maus
rpm	Umdrehung pro min
SUF	Sufentanil
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
ZNS	zentrales Nervensystem

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Agnati, L.F., Fuxe, K., Zini, I., Lenzi, P. und Hökfelt, T. (1980) Aspects on receptor regulation and isoreceptor identification. Medical Biology 58:182-187.
- 2 Akil, H., Mayer, D.J. und Liebeskind, J.C. (1976) Antagonism of stimulation produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. Science 191:961-962.
- 3 Ariens, E.J. (1979) Receptors: from fiction to fact. Trends Pharmacol. Sci. 1:11-15.
- 4 Bedell, C.R., Clark, R.B., Lowe, L.A., Wilkinson, S., Chang, K.J., Cuatrecasas, P. und Miller, R. (1977) A conformational analysis leucine-enkephalin using activity and binding data of synthetic analogues. Br. J. Pharmac. 61:351-356.
- 5 Bennett jun, J.P. (1978) Methods in binding studies. Neurotransmitter receptor binding. Ed.:Yamamura, H.I. und Enna, S.J., Raven Press, New York, 58-89.
- 6 Belluzzi, J.D., Garsky, V., Sarantakis, D., Wise, C.D. und Stein, L. (1976) Analgesia induced in vivo by central administration of enkephalins in rat. Nature 260:625-626.
- 7 Birdsall, N.J.M. (1982) Can different receptors interact differentially with each other. Trends in Neurosci. 5:139-140.

- 8 Bläsig, J. und Herz, A. (1976) Tolerance and dependence induced by morphine-like pituitary peptides in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 294: 297-300.
- 9 Blume, A.J. (1978) Interaction of ligands with opiate receptors of brain membranes: regulation by ions and nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1713-1717.
- 10 Bowen, W.D., Gentleman, S., Herkenham, M. und Pert, C.B. (1981) Interconverting μ and δ forms of type 1 opiate receptors in rat striatal patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4818-4822.
- 11 Brantl, V. und Teschemacher H. (1979) A material with opiod activity in bovine milk and milk products. *Arch. Pharmacol.* 306:301-304.
- 12 Braestrup C. und Nielson, M. (1980) Multiple benzodiazepine receptors. *Trends Neuropharm. Sci.* 3,12:301-303.
- 13 Burt, D.R. (1978) Criteria for receptor identification Neurotransmitter receptor binding. Ed.: Yamamura, H.J. und Enna, S.J., Raven Press, New York, 41-55.
- 14 Chang, K.J. und Cuatrecasas, P. (1979) Multiple opiate receptors: Enkephalin and morphine bind to receptors of different specificity. *J. Biol. Chem.* 254:2610-2618.
- 15 Chang, K.J., Cooper, B.R., Hazum, E. und Cuatrecasas, P. (1979) Multiple opiate receptors: Different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opiod peptides. *Molec. Pharmac.* 16: 91-104.

- 16 Chang, K.J., Hazum, E. und Cuatrecasas, P. (1980)
Multiple opiate receptors. Trends Neurochem. Sci. 3:
160-163.
- 17 Chang, K.J., Hazum, E. und Cuatrecasas, P. (1980)
Possible role of distinct morphine and enkephalin
receptors in mediating actions of benzomorphan drugs
(putative κ and σ agonists). Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 77:4469-4473.
- 18 Chang, K.J., Hazum, E., Killian, A. und Cuatrecasas,
P. (1981) Interactions of ligands with morphine and
enkephalin receptors are differentially affected by
guanine nucleotide. Molec. Pharmac. 20:1-7.
- 19 Chang, K.-J., Killian, A., Hazum, E., Cuatrecasas, P.
and Chang, J.-K. (1981) Morphiceptin ($\text{NH}_4\text{-Tyr-Pro-Phe-}$
 Pro-CONH_2): A potent and specific agonist for morphine
(μ) receptors. Science 212:75-77.
- 20 Chang, K.J., Hazum, E. und Cuatrecasas, P. (1981)
Novel opiate binding sites selective for benzomorphan
drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4141-4145.
- 21 Chavkin, J., James, I.F. und Goldstein, A. (1982)
Dynorphin is a specific ligand of the κ receptor.
Science 215:413-415.
- 22 Cheng, Y.C. und Prusoff, W.H. (1973) Relationship
between the inhibition constant (K_i) and the concen-
tration of inhibitor which causes 50% inhibition
(IC_{50}) of an enzymatic reaction. Biol. Pharmac. 22:
3099-3108.

- 23 Childers, S.R., Creese, I., Snowman, A.M. und Synder, S.H. (1979) Opiate receptor binding affected differentially by opiates and opioid peptides. *Europ. J. Pharmacol.* 55:11-18.
- 24 Childers, S.R. und Snyder, S.H. (1980) Differential regulation by guanine nucleotides of opiate agonist and antagonist receptor interactions. *J. Neurochem.* 34:583-593.
- 25 Clayton, R.N., Shakespear, R.A., Duncan, J.A. und Marshall, J.C., with Appendix by Munson, P.J. und Rodbard, D. (1979) Radioiodinated nondegradeable gonadotropin-releasing hormone analogs: new probes for the investigation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 105: 1369-1381.
- 26 DeCastro, J., van de Water, A., Wouters, L., Xhonneux, R., Reheman, R. und Kay, B. (1979) Comparative study of cardiovascular, neurological and metabolic side-effects of eight narcotic in dogs. *Acta Anaesth. Belg.* 30:5-99.
- 27 Enna, S.J. (1978) Radioreceptor assay technique for neurotransmitters and drugs. *Neurotransmitter receptor binding*. Ed.: Yamamura, H.I., Enna, S.J. und Kuhar, M.J., Raven Press, New York, 127-138.
- 28 Fischel, S.V. und Medzihradsky, F. (1981) Scatchard analysis of opiate receptor binding. *Molec. Pharmac.* 20:269-279.

- 29 Gilbert, P.E. und Martin, W.R. (1976) The effects of morphine und nalorphine-like drugs in the nondependent , morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. J. Pharmac. exp. Ther. 198:66-82.
- 30 Gillan, G.C., Paterson, S.J. und Kosterlitz, H.W. (1978) Further support for the hypothesis of multiple opiate receptors. Characterization and function of opioids. Ed.: Van Ree und Terenius, 475-477.
- 31 Gillan, G.C., Kosterlitz, H.W. und Paterson, S.J. (1980) Comparison of the binding characteristics of tritiated opiates and opioid peptides. Br. J. Pharmac. 70:481-490.
- 32 Gioaminni, T., Foucaud, B., Hiller, J.M., Hutten, M.E. und Simon, E.J. (1982) Lectin binding of solubilized opiate receptors: evidence for their glykoprotein nature. Biochem. Biophys. Res. Comm. 105:1128-1134.
- 33 Glowinski, J. und Iversen, L. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. J. Neurochem. 13: 655-669.
- 34 Goldstein, A., Lowney, L. und Pal, B.K. (1971) Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:1742-1747.
- 35 Goldstein, A., Aranow, L. und Kalman, S.W. (1974) Drug action, the basis of pharmacology. Ed.: J. Wiley, New York

- 36 Guril, N.J., Varsish, T., Reynolds, D.G. und Lechner, R.B. (1981) Opiate receptors and endorphins in the pathophysiology of hemorrhagic shock. *Surgery* 89: 364-369.
- 37 Harris, D.W. und Sethy, V.H. (1980) High affinity binding of [³H]ethylketocyclazocine to rat brain homogenate. *Europ. J. Pharmacol.* 66:121-123.
- 38 Herz, A., Albus, K., Metyš, J.H., Schubert, P. und Teschemacher, H.J. (1970) On the central sites for the antinociceptive action of morphine and fentanyl. *Neuroendocrinology* 9:539-550.
- 39 Hiller, J.M. und Simon, E.J. (1979) ³H EK binding: lack of evidence for a separate κ receptor in rat's CNS. *Europ. J. Pharmacol.* 60:389-390.
- 40 Höllt, V. (1983) Multiple endogenous opioid peptides. *Trends Neurosci.* 6:24-26.
- 41 Hughes, J. (1975) Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88:295-308.
- 42 Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. und Morris, H.R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577-579.
- 43 Iversen, L.L., Iversen, S.D. und Bloom, F.E. (1980) Opiate receptors influence vasopressin release from nerve terminals in rat neurohypophysis. *Nature* 284: 350-351.

- 44 Mc Knight, A.T., Corbett, A.D., Paterson, S.J.,
Magnan, J. und Kosterlitz, H.W. (1982) Comparison of
in vitro potencies in pharmacological and binding
assays after inhibition of peptidases reveals that
dynorphin 1-9 is a potent κ -agonist. Life Sci. 31:
1725-1728.
- 45 Kosterlitz, H.W. und Paterson, S.J. (1980) Charac-
terization of opioid receptors in nervous tissues.
Proc. R. Soc. B. 210:113-121.
- 46 Kosterlitz, H.W. (1980) Opiate receptors and their
exogenous and endogenous ligands. The role of pep-
tides in neuronal function. Ed.: Jeffry, L., Baker,
T.G., Smith jun., 700-709.
- 47 Kosterlitz, H.W., Paterson, S.J. und Robson, L.E.
(1981) Characterization of the κ -subtype of the
opiate receptor in the guinea-pig brain. Br. J.
Pharmacol. 73:439-449.
- 48 Leslie, F.M. und Kosterlitz, H.W. (1979) Comparison
of binding of [3 H]methionine-enkephalin, [3 H]-
naltrexone und [3 H]dihydromorphine in the mouse vas
deferens and the myenteric plexus and brain of the
guinea pig. Europ. J. Pharmacol. 56:379-383.
- 49 Leysen, J.E., Gommeren, W. und Niemegeers, C.J.E.
(1983) [3 H]Sufentanil, a superior ligand for μ -opiate
receptors: binding properties and regional distribu-
tion in rat brain and spinal cord. Europ. J. Pharma-
col. 87: 209-225.

- 50 Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J. und
Kosterlitz, H.W. (1976) Multiple opiate receptors.
Opiates and endogenous opioid peptides. Ed.: H.W.
Kosterlitz, 275-280.
- 51 Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J. und
Kosterlitz, H.W. (1977) Endogenous opioid peptides:
multiple agonists and receptors. *Nature* 267:497-499.
- 52 Martin, W.C. (1967) Opioid antagonists. *Pharmacol.*
Rev. 19:463-521.
- 53 Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler,
R.E. und Gilbert, P.E. (1976) The effects of morphine
and nalorphine-like drugs in the non-dependent and
morphine-dependent chronic spinal dog. *J.P.E.T.* 197:
517-532.
- 54 Molinoff, P.B., Wolfe, B.B. und Weiland, G.A. (1981)
Quantitative analysis of drug-receptor interactions:
II. Determination of the properties of receptor sub-
types. *Life Sci.* 29:427-443.
- 55 Munson, P.J. und Rodbard, D. (1980) Ligand: A versa-
tile computerized approach for characterization of
ligand-binding systems. *Anal. Biochem.* 107:220-239.
- 56 Niemegeers, C.J.E., Schellekens, K.H.L., van Bever,
W.F.M. und Janssen, P.A.J. (1976) Sufentanil, a very
potent and extremely safe intravenous morphine-like
compound in mice, rats and dogs. *Arzneim.-Forsch.*
(Drug Res.) 26, Nr. 8:1551-1556.

- 57 Pasternak, G.W., Snowman, A.M. und Snyder, S.H. (1975)
Selective enhancement of [³H]opiate agonist binding by
divalent cations. *Molec. Pharmac.* 11:735-744.
- 58 Pasternak, E.W. (1980) Multiple opiate receptors:
[³H] ethylketocyclazocine receptor binding and
ketocyclazocine analgesia. *PNAS* 77/6:3691-3694.
- 59 Pasternak, G.W., Buatti, M.G. und Spiegel, K. (1981)
The binding and analgesic properties of a sigma
opiate SKF 10.047. *JPET* 219:192-198.
- 60 Peeters, O.M., Bluton, N.M., deRanter, G.J. (1979)
N-(4-(Methoxymethyl)-1-[2-(2-thienyl)ethyl]-4-piperi-
diny)-N-phenylpropanamide: SUFENTANIL. *Acta Cryst.*
B 35: 999-1001.
- 61 Pert, C.B. und Snyder, S.H. (1973) Opiate receptor:
demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011-
1014.
- 62 Pert, C.B., Pasternak, G.W. und Snyder, S.H. (1973)
Opiate agonists and antagonists discriminated by
receptor binding in brain. *Science* 182:1359-1361.
- 63 Pert, C.B. und Snyder, S.H. (1973) Properties of
opiate receptor binding in rat brain. *PNAS* 70/8:
2243-2247.
- 64 Pert, C.B. und Snyder, S.H. (1974) Opiate receptor
binding of agonists and antagonists affected differ-
entially by sodium. *Molec. Pharmac.* 10:868-879.

- 65 Pert, C.B. und Tayler, D. (1978) Type 1 and type 2 opiate receptors :A subclassification scheme based upon GTP's differential effects on binding. Endogenous and Exogenous Opiate Agonists and Antagonists. Ed.: E.E. Way, Pergamon Press, New York.
- 66 Pfeiffer, A. und Herz, A. (1981) Demonstration and distribution of an opiate binding site in rat brain with high affinity for ethylketocyclazocine and SKF 10.047. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101:38-44.
- 67 Pfeiffer, A. und Herz, A. (1981) Discrimination of three opiate receptor binding sites with the use of a computerized curve fitting technique. Molec. Pharmac. 21:266-271.
- 68 Pfeiffer, A., Pasi, A. Mehraein, P. und Herz, A. (1981) A subclassification of κ -sites in human brain by use of dynorphin₁₋₁₇. Neuropeptides 2:89-97.
- 69 Pfeiffer, A. und Herz, A. (1982) Mixed type inhibition of (D-Ala²,D-Leu⁵)-enkephalin binding to μ -opiate binding sites by μ - but not by κ -opiate ligands. Europ. J. Pharmacol. 77:359-361.
- 70 Porthogese, P.S. (1966). Stereochemical factors and receptor interactions associated with narcotic analgesics. J. Pharmaceut. Sci. 55:865-887.
- 71 Rance, M.J., Kobylecki, R.J., Lane, A.C., Holgate, M.J. und Barnard, E.A. (1981) Arylasido-derivates of 14B-aminomorphinone. Potential photoaffinity ligands for opiate receptors. In: Advances in Endogenous and Exogenous Opioids. Proc. of the Int. Narcotic Res. Conf., Kyoto, Japan.

- 72 Robson, L.E. und Kosterlitz, H.W. (1979) Specific protection of the binding sites of D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin and dihydromorphine. Proc. R. Soc. London 205:425-432.
- 73 Römer, D., Büscher, H.H., Hill, R.C., Pless, J. und Huquanic, R. (1977) A synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity. Science 268:547-549.
- 74 Rodbell, M. (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature 284:17-22.
- 75 Rothman, R.B. und Westfall, T.C. (1981) Allosteric modulation by leucine-enkephalin of the binding of ³H-naloxone in rat brain. Europ. J. Pharmacol. 72: 365-368.
- 76 Rubini, P., Schulz, R., Wüster, M. und Herz, A. (1982) Opiate receptor binding studies in the mouse vas deferens exhibiting tolerance without dependence. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319:142-146.
- 77 Scatchard, E. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. NY Acad. Sci. 51:660-674.
- 78 Schulz, R., Wüster, M., Krenss, H. und Herz, A. (1980) Selective development of tolerance without dependence in multiple opiate receptors of mouse vas deferens. Nature 285:242-243.

- 79 Schulz, R., Wüster, M., Krenns, H. und Herz, A. (1980)
Lack of cross-tolerance on multiple opiate receptors
in the mouse vas deferens. *Molec. Pharmac.* 18:395-401.
- 80 Schulz, R., Wüster, M. und Herz, A. (1980) Pharmacological
characterization of the ϵ -opiate receptor.
J. Pharm. exp. Ther. 716,3:604-607.
- 81 Schulz, R., Wüster, M., Rubini, P. und Herz, A. (1981)
Functional opiate receptors in the guinea-pig ileum:
Their differentiation by means of selective tolerance
development. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 219:547-550.
- 82 Schulz, R. und Wüster, M. (1981) Are there subtypes
(isoreceptors) of multiple opiate receptors in the
mouse vas deferens? *Europ. J. Pharmacol.* 76:61-66.
- 83 Schulz, R., Wilhelm, A., Pirke, K.M., Gramsch, C. und
Herz, A. (1981) δ -Endorphin and dynorphin control
serum luteinizing hormone level in immature female
rats. *Nature* 264:757-759.
- 84 Simon, E.J., Hiller, J.M. und Edelman, I. (1973)
Stereospecific binding of the potent narcotic anal-
gesic [3 H]etorphine to rat brain homogenate. *Proc.*
Natl. Acad. Sci. 70:1947-1949.
- 85 Simon, E.J., Hiller, J.M., Groth, J. und Edelman, I.
(1975) Further properties of stereospecific opiate
binding sites in rat brain: on the nature of the
sodium effect. *J. Pharm. exp. Ther.* 192:531-537.

- 86 Smith, J.R. und Simon, E.J. (1980) Selective protection of stereospecific enkephalin and opiate binding against inactivation by N-ethylmaleimide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 281-284.
- 87 Snyder, S.H., Pasternak, G.W. und Pert, C.B. (1975) Opiate receptor mechanism. *Handbook of psychopharmacology 5 Synaptic Modulators*. Ed.: Iversen, L.L., Iverssen, S.D., Snyder, S.H.. 329-360.
- 88 Snyder, S.H. und Pert, C.B. (1975) Membrane receptor. *Neurosci. Res. Progr. Bull.* 13:27-34.
- 89 Snyder, S.H. (1977) Opiate receptors and internal opiates. *Scientific American* 236:44-56.
- 90 Snyder, S.H. und Goodman, R.R. (1980) Neurotransmitter receptors. *J. Neurochem.* 35:5-15.
- 91 Stautner, C., Wüster, M., Schulz, R. und Herz, A. (1982) A differential interaction of putative μ -selective agonists with opiate binding sites in rat brain. *Neurochem. Int.* 4,6:557-561.
- 92 Terenius, L. (1973) Stereospecific uptake of narcotic analgesics by a subcellular fraction of the guinea-pig ileum. *J. Med. Science* 78:150-152.
- 93 Teschemacher, H.J. (1978) Endogenous ligands of opiate receptors (endorphins). *Developments in Opiate Research*. Ed.: A. Herz, Dekker, New York, 67-125.

- 94 Van Bever, W.F.M., Niemeegers, C.J.E., Schellekens, K.H.L. und Janssen, P.A.J. (1976). N-4-Substituted 1-(2-arylethyl)-4-piperidiny-N-phenylpropanamides, a novel series of extremely potent analgesics with unusually high safety margin. *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 26,8:1548-1550.
- 95 Van Daele, P.G.H., De Bruyn, M.F.L., Boly, J.M., Sanczuk, S., Hgten, J.T.M. und Janssen, P.A.J. (1976) Synthetic analgesics N-(1-[2-amylethyl]-4-substituted 4-piperidiny)-Arylalkanamides. *Arzneim. Forsch.* 26,8: 1521-1531.
- 96 Williams, L.T. und Lefkowitz (1978) Receptor binding studies in adrenergic pharmacology. R.J., Raven Press, 27-83.
- 97 Wolozin, B.L. und Pasternak, S.W. (1981) Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:6181-6185.
- 98 Wüster, M., Schulz, R. und Herz, A. (1979) Specificity of opioids towards the μ - δ - and ϵ -opiate receptors. *Neurosci. Lett.* 15:193-198.
- 99 Wüster, M., Schulz, R. und Herz, A. (1980) The direction of opioid agonists towards μ -, δ - and ϵ -receptors in the vas deferens of the mouse and the rat. *Life Sci.* 27: 163-170.
- 100 Wüster, M., Schulz, R. und Herz, A. (1980) Highly specific opiate receptors for dynorphin(1-13) in the mouse vas deferens. *Europ. J. Pharmacol.* 62:235-236.

- 101 Wüster, M., Schulz, R. und Herz, A. (1981). Multiple opiate receptors in peripheral tissue preparations. *Biochem. Pharmacol.* 30:1883-1887.
- 102 Wüster, M., Rubini, P. und Schulz, R. (1981) The preference of putative pro-enkephalins for different types of opiate receptors. *Life Sci.* 29:1219-1227.
- 103 Zivin, J.A. und Douglas, R.W. (1982) How to analyze binding enzyme and uptake data; the simplest case a single phase. *Life Sci.* 30:1407-1422.

Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am	9. Juni 1958
in	Ingolstadt
Eltern	Franz Stautner, Kaufmann Maria Stautner, geb. Sutner
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildungsdaten

Schulausbildung	1964-1968	Grundschule in Ingolstadt
	1968-1977	Katharinengymnasium Ingolstadt
Studium	1977-1978	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	1978-1984	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	1980	Ärztl. Vorprüfung
	1981	1. Ärztl. Prüfung
	1983	2. Ärztl. Prüfung
	1984	3. Ärztl. Prüfung
	1984	Approbation zum Arzt
		Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
Promotion	1981-1984	Abt. Neuropharmakologie Die Interaktion von Sufen- tanil mit spezifischen Bin- dungsstellen im ZNS

HERSTELLUNG:

PROFI-DRUCK

ADALBERTSTR. 10 RG

8000 MÜNCHEN 40

TEL: 39 07 27

